

**L - Serin - dehydratase beim Flußkrebs  
Orconectes limosus  
Reinigung und physiologische Eigenschaften**

**Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
des  
Fachbereichs Biologie  
der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Ingo Tofaute  
aus Würzburg**

**1976**



L-Serin - dehydratase beim Flocken  
Oocystes limosa  
Reinigung und physiologische Eigenschaften



Digitized by the Internet Archive  
in 2026



**L - Serin - dehydratase beim Flußkrebs  
Orconectes limosus  
Reinigung und physiologische Eigenschaften**

**Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
des  
Fachbereichs Biologie  
der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Ingo Tofaute  
aus Würzburg**



1. Referent : Prof.Dr.E.-R. Lochmann

2. Referent : Prof.Dr.K. Graszynski

Tag der mündlichen Prüfung: 28.6.76.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Tierphysiologie und angewandte Zoologie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Prof. K. Urich danke ich für Themenvergabe und Beratung (bes. bei der Zusammenschrift). Mein Dank gilt denjenigen techn. u. wissenschaftlichen Mitarbeitern, die mir ein ungehindertes Arbeiten an meinem Thema ermöglichten oder mir sonst eine Hilfe waren. Besonders danke ich in diesem Zusammenhang an den ehemaligen Hausmeister des Instituts Herbert Schwoch.

Ferner danke ich folgenden Instituten, die mir eine Inanspruchnahme ihrer Meßgeräte ermöglichten: Zentralinstitut für Biochemie u. Biophysik der FU, Bundesanstalt für Materialprüfung (Berlin), Biologische Anstalt Helgoland (Hamburg, D.Siebers).

## INHALTSVERZEICHNIS

Seite

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| - Abkürzungen                                                                             | 4  |
| - Einleitung                                                                              | 5  |
| I. L-Serin Dehydratase (Reinigung)                                                        | 8  |
| 1. Material und Methoden                                                                  | 8  |
| 1.1. Tiermaterial                                                                         | 8  |
| 1.2. Reagenzien                                                                           | 8  |
| 1.3. Präparation der Gewebe                                                               | 8  |
| 1.4. Bestimmung der Enzymaktivitäten                                                      | 9  |
| 1.5. Elektrophorese                                                                       | 10 |
| 1.6. Zur Ermittlung der Enzymaktivität der Cystathionin<br>Synthase                       | 11 |
| 1.7. Radioaktivitätsbestimmungen                                                          | 12 |
| 1.8. Proteinbestimmung                                                                    | 12 |
| 2. Ergebnisse und Diskussion                                                              | 13 |
| 2.1. Enzymtest                                                                            | 13 |
| 2.2. Reinigung d. S(T)DH aus Antennendrüsen v. O. lim.                                    | 14 |
| 2.3. Identifizierung der L-Cystathionin- $\beta$ -Synthase und<br>deren Beziehung zur SDH | 19 |
| 2.3.1. Identifizierung und Abtrennung v. L-Cystathionin                                   | 19 |
| 2.3.2. Ermittlung d. spezif. Aktivität der CYSS                                           | 21 |
| 2.3.3. Beziehung zur SDH im Vergleich mit anderen CYSS                                    | 21 |
| 2.4. Elektrophoretische Analyse d. gereinigten Enzyms                                     | 22 |
| 2.4.1. Vergleich verschiedener Enzymbanden                                                | 22 |
| 2.4.2. Identifizierung d. Krebsenzym b. d. Diskelektrophor.                               | 23 |
| 2.5. Bestimmung d. Affinität d. Enzyms zu Pyridoxalphosp.                                 | 24 |
| 2.6. Molekulargewichtsbestimmung                                                          | 26 |
| 2.7. Reaktionskinetik                                                                     | 30 |
| 2.7.1. Puffersysteme und pH-Optima                                                        | 30 |
| 2.7.2. Aktivatoren und allosterische Effekte                                              | 32 |
| 2.7.3. Spezifität des Enzyms                                                              | 34 |
| 2.8. Kinetische Konstanten                                                                | 34 |
| 2.8.1. Bestimmung der Michaeliskonstanten                                                 | 34 |
| 2.8.2. Inhibition                                                                         | 36 |
| 2.8.2.1. Inhibitionskonstanten                                                            | 36 |
| 2.8.2.2. Mischinkubationen                                                                | 39 |
| II. L-Serin Dehydratase (physiologische Eigenschaften)                                    | 42 |
| 1. Ergänzungen zur Methodik                                                               | 42 |

|      |                                                                                                                    |    |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. | Statistik                                                                                                          | 42 |
| 2.   | Ergebnisse und Diskussion                                                                                          | 43 |
| 2.1. | Lokalisation des Enzyms in der Zelle                                                                               | 43 |
| 2.2. | Aktivität der L-Serin Dehydratase: Organverteilung<br>u. jahreszyklische Veränderungen i. d. Organen               | 43 |
| 2.3. | Hungerinduktion der L-Serin Dehydratase                                                                            | 49 |
| 2.4. | Häutung, Vorhäutungsstadien u. Enzymaktivität                                                                      | 51 |
| 2.5. | Wirkung der Augenstielamputation                                                                                   | 54 |
| 2.6. | Induktion u. Repression: Abhängigkeit der L-Serin-<br>Dehydratase-Aktivität von Substrat- und<br>Glucoseintubation | 55 |
| 2.7. | Osmoregulation und Enzymaktivität                                                                                  | 59 |
| -    | Schlußbetrachtung                                                                                                  | 61 |
| -    | Zusammenfassung                                                                                                    | 63 |
| -    | Literaturverzeichnis                                                                                               | 65 |
| -    | Lebenslauf                                                                                                         | 75 |

## ABKÜRZUNGEN

|                  |   |                                           |
|------------------|---|-------------------------------------------|
| SDH              | = | Serin Dehydratase                         |
| TDH              | = | Threonin Dehydratase                      |
| LDH              | = | Lactat - Dehydrogenase                    |
| CYSS             | = | Cystathionin Synthase                     |
| CYS              | = | L-Cystathionin                            |
| AS               | = | Aminosäure(n)                             |
| PP               | = | Pyridoxalphosphat                         |
| NADH             | = | Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert |
| AMP              | = | Adenosin-5'-monophosphat                  |
| ADP              | = | " -5'-diphosphat                          |
| ATP              | = | " -5'-triphosphat                         |
| GDP              | = | Guanosin-5'-diphosphat                    |
| IDP              | = | Inosin-5'-diphosphat                      |
| $K_m$            | = | Michaeliskonstante                        |
| $K_i$            | = | Hemmkonstante                             |
| Ipm              | = | Impulse pro Minute                        |
| dpm              | = | radioaktive Zerfälle pro Minute           |
| EDTA             | = | Äthylendiamin-tetraessigsäure             |
| KP-              | = | Kaliumphosphat- (puffer)                  |
| TRIS             | = | Tris (hydroxymethyl)-aminomethan          |
| DEAE - Cellulose | = | Diäthylaminoäthylcellulose                |
|                  |   |                                           |
| Adr              | = | Antennendrüse                             |
| Ki               | = | Kiemer                                    |
| Ho               | = | Hoden                                     |
| Ov               | = | Ovar                                      |
| Mdd              | = | Mitteldarmdrüse                           |
| He               | = | Herz                                      |
| HL               | = | Hämolymph                                 |
|                  |   |                                           |
| M                | = | Molarität                                 |
| nM               | = | nano-Mol                                  |
| mCi              | = | millicurie                                |

## EINLEITUNG

L-Serin Dehydratase (E.C. 4.2.1.13) katalysiert einen besonderen Abbauweg im Aminosäurestoffwechsel ( der Hydroxyamino-säuren L-Serin und L-Threonin).

Entdeckt wurde das Enzym von CHARGAFF, E. u. D.B. SPRINSON (1943) bei "Bacterium coli". Seitdem ist seine Aktivität bei vielen Organismen, von Mikroorganismen wie *Pseudomonas putida* (COHN 1974), *Neurospora* (YANOFSKY 1953), *Agaricus bisporus* (KAGAN 1969a), *Melampyrum nemorosum* (KAGAN 1969b) u. a. bis hin zu Wirbeltieren wie Schaf (SAYRE 1956), Huhn (GRILLO 1970), Ratte (PITOT 1961 u.a.) und Mensch (MUDD 1965b), dagegen kaum bei Wirbellosen nachgewiesen worden.

Besonders intensiv untersucht wurde das Enzym bei der Rattenleber, wie überhaupt das Enzym bei Organen mit erhöhter Stoffwechselaktivität vorkommt, wie Leber u. Niere (GRILLO 1970, YOSHIDA 1973: bei beiden), wobei bemerkenswert ist, daß in der Niere auch eine D-spezifische SDH vorhanden sein kann (GRILLO 1970, 1973: b. Vögeln u. Amphibien mit höherer Aktivität als L-SDH).

URICH (1967a) fand beim Flußkrebs *Orconectes limosus* eine hohe SDH-Aktivität, die trotz wesentlich geringerer Stoffwechselaktivität beim Krebs keineswegs geringer war als bei der Ratte. Eine eingehendere Untersuchung sollte daher eine Begründung für diese hohe Enzymaktivität beim Krebs liefern. Da beim D-Aminosäurestoffwechsel beim Krebs Besonderheiten vorlagen (URICH 1968), die durch Reinigung offengelegt worden waren, sollte auch bei der SDH eine Reinigung versucht werden, zumal sich beim Rattenleberenzym Schwierigkeiten aus noch unvollkommen gereinigten Enzymfraktionen ergeben hatten. Man wußte nicht, ob die L-SDH und L-TDH mehrere Enzyme oder nur eines waren (SAYRE 1956, NISHIMURA 1961), außerdem schrieb man dem Enzym noch die Fähigkeit zu, Cystathionin aus Homocystein u. Serin zu synthetisieren (SEELIM 1959, GOLDSTEIN 1962, sowie NAGABHUSHANAM 1965). BROWN 1966 gelang es, die L-Cystathionin- $\beta$ -Synthase (E.C. 4.2.1.21) als eigenständiges Enzym von der L-SDH zu trennen, wovon einigen Autoren auch als Cystathionin "Synthetase" bezeichnet (NAGABHUSHANAM 1965, NAKAGAWA 1969) wird.

MUDD 1965 berichtet von einer SDH bei Menschen, bei denen keine Cystathionin Synthase vorhanden war. Weiterhin berichtet NAKAGAWA 1967 über die beiden verschiedenen Enzyme und merkt an, daß die Antikörper gegen gereinigte SDH im Rohextrakt Cystathionin Synthase nicht, wohl aber die Aktivität des Enzyms gegen Serin und auch Threonin hemmen. Aufgrund dieser, sowie anderer, kinetischer, Daten sprechen manche Autoren (HOSHINO 1972, D. SIMON 1973 u. 1974) von L-Serin(Threonin) Dehydratase [L-serine hydrolase (deaminating) EC 4.2.1.13]. Entsprechend ist in dieser Arbeit für das Krebsenzym von S(T)DH die Rede, bei SDH oder TDH ist die Aktivität des gleichen Enzyms (EC 4.2.1.13) gegenüber dem jeweiligen Substrat gemeint. Allerdings gibt es auch L-Threonin spezifische Dehydratasen (EC 4.2.1.16) bei Mikroorganismen, sowie bei der Schafleber (DAVIS 1962, sowie NISHIMURA 1961). Allgemein können beide Enzyme jeweils das Substrat des anderen Enzyms umsetzen. Eine Antwort auf die Frage nach der Ursache unterschiedlicher  $\frac{SDH}{TDH}$ -Quotienten bei verschiedenen Reinigungen gab HOSHINO 1972 durch Untersuchung der Wirkung von Aktivatoren.

Während bei anderen Enzymen die Molekulargewichte wesentlich weniger differieren (zB. LDH), sind bei SDH und TDH z.T. bei der gleichen Spezies wesentliche Unterschiede festgestellt worden. Eine mögliche Erklärung wäre vielleicht das verbreitete Vorkommen des Enzyms bei Organismen von sehr unterschiedlicher Art und daraus (mehrfach starke Veränderungen der Molekülgröße im Laufe der Evolution) resultierender phylogenetischer Vielfalt. Dies würde auch erklären, weshalb manche Autoren von Desaminierung nur einer der beiden L-Aminosäuren berichten, speziell bei Mikroorganismen, was auf die bei diesen weitverbreitete große Mutationsfähigkeit zurückgeführt werden kann. Bei solchen Mikroorganismen konnten auch Untereinheiten (WHITELEY 1966) bzw. Quartärstruktur (J.P. SIMON 1974) des Enzyms nachgewiesen werden. Beim Rattenleberenzym konnte man zwischen induzierter und "nativer" L-SDH unterscheiden (HOSHINO 1969b u. 1971).

Zu den näheren Untersuchungen (Reinigungen) des Enzyms bei Mikroorganismen und Wirbeltieren versteht sich diese Arbeit über die Eigenschaften des Enzyms bei einem Vertreter der

Wirbellosen als ergänzender Beitrag. Nicht zuletzt soll eine Beschäftigung auch mit den physiologischen Eigenschaften des Enzyms als Ergänzung eines am hiesigen Institut durchgeführten Forschungsprogramms dienen, das die Analyse des Stoffwechsels eines Vertreters der dekapoden Crustaceen zum Ziel hatte.

In der Literatur wird von verschiedenen physiologischen Eigenschaften des Enzyms - bei wiederum fehlenden Untersuchungen an wirbellosen Tieren - berichtet: Durch vielfältige Art der Induktion und Regulation stehen L-SDH u. L-TDH in enger Beziehung zum Glucosestoffwechsel, sind doch ihre Reaktionsprodukte Pyruvat, bzw.  $\alpha$ -Ketobutyrat. Die Regulation des Glucosestoffwechsels kann einhergehen mit einer Induktion des Enzyms durch Proteindiät u. Hunger (GOLDSTEIN 1962, FALLON 1968, PITOT 1961, SAWAKI 1970, ANDERSON 1969, HARPER 1965, HOSHINO 1969a+b, SCHMIDINGER 1967, STRAUB 1970, ISHIKAWA 1965, PITOT 1964, alle Untersuchungen an Rattenleber), beeinflusst durch die Wirkung von Insulin (FREEDLAND 1966, YAMASHITA 1969) und Glucagon (ISHIKAWA 1970). In diesem Zusammenhang untersuchte man die Wirkung von anderen Hormonen, bzw. diese beeinflussende Substanzen (PERAINO 1964; Thyroxin+Cortison: KU 1969; Cortison+Phenobarbital: PERAINO 1966, NAKAGAWA 1969; Glucagon+ 5'-Fluorocrotonsäure, bzw. Katecholamine: MOHRENWEISER 1974, bzw. 1973; Hydrocortison: GOLDSTEIN 1962 u. LEFAUCONNIER 1973 an Rattenleber, GRILLO 1970 an Hühnerleber u. -niere;). Z.T. maß man an perfundierten Rattenlebern (CHAN 1971, MOHRENWEISER 1972, SANDOVAL 1974), oder bei Ratten, die Stress durch Vibrationen ausgesetzt waren (MISZCZACK 1974). Außerdem wird von einer Wirkung von Aminosäuren auf die Enzyminduktion berichtet (ANDERSON 1969, PERAINO 1965, SAYRE 1956\*, JOST 1968, MAURON 1973). Die Injektion von  $\beta$ ,5'-cyclischem AMP kann die SDH-Aktivität erhöhen (Rattenleber: JOST 1969, 1970, bzw. SNELL 1974, bei Jungtieren).

Außer bei der Rattenleber wurde noch bei der Schafleber durch eine hohe Proteindiät eine Enzyminduktion erzielt (JOONAN 1974).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Reinigung, Charakterisierung u. den physiologischen Eigenschaften der *Orconectes*-SDH, um damit zum besseren Verständnis des Stoffwechselgeschehens beim Flußkrebis beizutragen.

# I. L-Serindehydratase (Reinigung)

## 1. MATERIAL UND METHODEN

### 1.1 Tiermaterial:

Das Versuchsobjekt, der Flußkreb Orconectes limosus Rafinesque (=Cambarus affinis Say), stammt aus der Havel bei Berlin-Spandau. Die Krebse wurden von Fischern bezogen und (außer Häutungstieren) bei einer konstanten Photoperiode von 12 Stunden und Wassertemperaturen um 15°C unter fließendem Wasser im Keller des Instituts in Eternitbecken gehalten. Die Tiere waren 20 bis 28 g schwer, sofern nicht gesondert angegeben, und wurden zweimal wöchentlich mit Herzfleisch gefüttert außer bei bestimmten physiologischen Versuchen.

Die Entwicklungs- und Häutungsstadien wurden angelehnt an DRACH 1939 und modifiziert nach STEVENSON 1968 und KELLER 1970\* nach Gastrolitnenbildung und Uropodenborstenentwicklung klassifiziert.

### 1.2. Reagenzien:

Die verwendeten Reagenzien waren von p.a. Qualität und wurden, soweit nicht gesondert angegeben, von Merck/Darmstadt bezogen.

Es lieferten:

Calbiochem: Dithioerythrit (Dithiothreitol), L-Cystathionin

Serva/Heidelberg: L-Serin, L-Threonin, Dithioerythrit, Acrylamid  
DEAE-Cellulose, Dowex

Fluka/Buchs (Schweiz): D-Serin, D-Threonin, L-Homoserin, DL-Homocystein, Pyridoxalphosphat

Boehringer/Mannheim: NADH, AMP, ADP, ATP

Behring-W./Marburg: krist. Rinderserumalbumin

The Radiochemical Centre/Amersham: L-Serin-C14(U)

### 1.3. Präparation der Gewebe:

Die Krebse wurden entweder durch Einfrieren über 20 min bei -30°C in der Tiefkühltruhe oder durch Zerstören des Bauchmarks getötet. Die letztere Methode wurde bei allen physiologischen Versuchen angewendet.

\* kombiniert mit KÜMMEL 1970

Die Organe wurden schnell entnommen, kurz auf Filterpapier abgetupft, gewogen und in der Regel in 1,2 % KCl in einem Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonstempel kurz und schonend (POTTER 1960) unter Eiskühlung homogenisiert. Falls nicht anders angegeben, wurden die Homogenate 30 min bei 20 000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  in der Eispirouette (Fa. Epywe, Göttingen) zentrifugiert. Die Überstände wurden so schnell wie möglich gemessen, da das Enzym seine Aktivität nach einem Zeitraum von 2 h rasch verliert, so dass alle Messreihen innerhalb dieser Zeit abgeschlossen werden mussten. Organe, die durch Proteasen ihre Aktivität am schnellsten verloren, wurden zuerst gemessen, wie z. B. die Mitteldarmdrüse bei der Organverteilung; als Antennendrüse wird der Exkretionsapparat ausschließlich der Harnblase bezeichnet.

#### 1.4. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte nach der von WARBURG 1956 angegebenen Methode des optischen Tests, durch Kopplung des Reaktionsprodukts mit LDH und  $\text{NADH}^{+}$ . Der Reaktionsverlauf wurde nach Temperieren des Küvetteninhalts, Messung des Leerwerts und Starten der Reaktion durch Substratzugabe im auf  $25^{\circ}\text{C}$  temperierten Küvettenhalter bei 366 nm in einem Eppendorf-Photometer (Fa. Netneler und Hinz, Hamburg) mittels eines Phillips-Kompensationsschreibers mit Linearisierungseinheit (Netneler und Hinz) als Extinktionsänderung registriert. Einer Extinktionsänderung von 0,1 bei 366 nm entspricht ein Substratumsatz von 30,3 nMol pro ml Küvetteninhalt und 1 cm Schichtdicke.

Die (spezifische) Aktivität wird in mU der internationalen Einheit U angegeben, also in  $10^{-9}$  Mol Substratumsatz pro (mg Protein und) Minute.

##### Anmerkungen zum Optischen Test:

Das Enzym wurde im linearen Bereich gemessen, unter optimalen Bedingungen. Da Verdünnung das empfindliche Enzym in seiner Aktivität beeinträchtigte, wurde mit 10%-igen Homogenaten gearbeitet (Frischgewicht/Volumen). Eine Proteinkonzentrierung darüber hinaus brachte keine weitere Erhöhung der spezifischen Aktivität. Diese veränderte sich auch nicht durch Halbierung

oder Verdopplung der KADH -Konzentration. Selbstverständlich, wie auch bei allen Reinigungsschritten, war die Anwesenheit von Pyridoxalphosphat zur Stabilisierung erforderlich.

Die L-Serin (Threonin) Denydratase kann man nach zwei verschiedenen Methoden bestimmen:

- a) nach der 2,4-Dinitrophenylhydrazin Methode, bei der die während der Inkubation gebildete  $\alpha$ -Ketosäure nach FRIEDEMANN 1943 ermittelt wird. Diese Methode beruht auf der Messung der Farbe des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der Ketosäure in alkalischer Lösung, und wurde auch von URICH 1967a angewendet.
- b) nach der vorher beschriebenen optischen, direkten Methode. FREEDLAND 1964, sowie VANQUICKENBORNE 1968, haben beide Methoden angewendet und fanden eine Linearität der Aktivität gegenüber der Enzymkonzentration mit der direkten spektrophotometrischen Methode, während man bei der Methode nach FRIEDEMANN bei zwei verschiedenen Enzymkonzentrationen messen und korrigieren mußte. Ein weiterer Vorteil der optischen Methode ist die schnelle Messung der Enzymaktivität. Bei Reinigungen ergab sich so eine schnellere Ermittlung der aktiven Fraktionen, die dann schneller weiterverarbeitet, bzw. konserviert werden konnten. Beim Krebseozym wurden nach Vergleich beider Methoden gleiche Werte erhalten, aufgrund der genannten Vorteile dann die optische Methode bevorzugt.

#### 1.5. Elektrophorese:

Es wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach MAURER (1968) durchgeführt. Soweit nicht anders beschrieben, wurde das Puffersystem Nr.1 nach MAURER (1968) und 7,5% Gele in Elektrophoreseröhrchen von 6,8 mm Durchmesser verwendet. Bis zu 120  $\mu$ g Protein in 35%-iger Sucroslösung wurden durch vorsichtiges Unterschichten des -elektrodenpuffers aufgetragen. Bromphenolblau diente als Markierung der Wandereschwindigkeit. Bei einer Trennlänge von 7-8 cm wurde die Elektrophorese im Kühlschranks bei konstanter Stromstärke von 4mA pro Gelröhrchen und einer Spannung von ~220 V durchgeführt, sowie einer Laufzeit von ~2 1/2 Stunden. Die Proteinanfärbung erfolgte mit 1% Amidoschwarz 10B in 7% Essigsäure für 5-10min. Differenziert wurde in 7% Essigsäure über 48 Stunden.

### 1.6. Zur Ermittlung der Enzymaktivität der Cystathionin Synthase:

Da das Enzym nicht direkt (im gekoppelten optischen Test) in seiner Aktivität bestimmt werden konnte, wurde eine Endwert-Methode verwendet. Für die Isolierung und Identifizierung der L-Cystathionin Synthase (CYSS) wurden drei Methoden verglichen, die in jedem Fall auf eine Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung des gebildeten Cystathionins (CYS) hinausliefen. Dies war bei der vermuteten Größenordnung der Enzymaktivität nur durch radioaktive Markierung von CYS (erreicht durch Inkubation mit radioaktiv angereichertem Substrat) und Messung der Radioaktivität CYS-enthaltender Fraktionen möglich.

- a) Bei der Kieselgel-Methode wurde die gesamte nach Enzyminkubation und folgeschritten resultierende Gesamtprobe nach Entsalzung über Kieselgel G mit unmarkiertem CYS versetzt und 2-Dimensional mit den Fließmitteln Phenol/H<sub>2</sub>O (75:25, +20mg KCN pro 100ml Mischung), sowie einem Butanolgemisch (n-Butanol/Eisessig/Wasser 80:20:20) über Kieselgel G differenziert. Die mittels Ninhydrinanfärbung identifizierte CYS-Stelle wurde aus dem Kieselgel gekratzt, in ein Zählgläschen mit Szintillatorgemisch überführt und auf ihre Radioaktivität hin überprüft. Diese Methode wurde später nur als ergänzende Kontrolle der folgenden Methoden in Erwägung gezogen.
- b) Die DOWEX-Methode war erfolgreicher. Dabei wurde die zu untersuchende Probe auf eine DOWEX 50 X8 200-400 mesh Säule (1x15 cm) aufgetragen, äquilibriert und eluiert mit 0,2M Na-Citrat-puffer pH 3,1 (5ml-Fraktionen, 26 ml/h Durchfluss). Nach Elution von 75ml wurde einer 50ml-Mischkammer (konstantes Volumen) der gleiche Puffer pH 4,2 angeschlossen und im Gradienten eluiert. Die Probe wurde in den ersten vier Fraktionen in Serin, in der 25. in CYS aufgetrennt (ermittelt durch Messung der Radioaktivität und des AS-Gehalts jeder Fraktion).
- c) Am erfolgreichsten war ein Aufbringen der Probe auf eine lange Säule im Beckmann Unicrom AS-Analysator. Diese Säule enthielt Harz vom M72-Typ (8% Quervernetzung), mit 0,3M Citratpuffer pH 3,28 inkubiert. Da das AS-Eichgemisch AS von bekannter Molarität enthielt (25 nM, CYS 100 nM), konnte bei der Auftrennung des Proben-gemisches jedem AS-Peak im Eluat (im angeschlossenen Fraktions-sammler aufgefangen) eine bestimmte Radioaktivität zugeordnet

werden, was eine exakte Aussage über die Menge an gebildetem CYS zuließ. Die Elution erfolgte bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 110 ml/h, einer Säulentemperatur von 55°C, Pufferwechsel auf 0,3M Citratpuffer pH 4,25 nach 90 min., sowie einer Trennzeit von 2 h und wurde bei 570 nm mit einem angeschlossenen Schreiber registriert.

#### 1.7. Radioaktivitätsbestimmungen:

Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten mit einem Flüssigkeits-scintillationszähler Betamatic 40 (Tracerlab).

Die bis zur AS-Auftrennung entnommenen Proben wurden mit 0,5ml Athanolamin versetzt. Als Scintillationsgemisch wurde ein Toluol-Methanolgemisch (8:2 v/v, mit 50 mg/l POPOP und 4 g/l PPO), bei Proben aus dem AS-Analysator-eluat wurde Aquasol verwendet.

Bei Kieselgel enthaltenden Proben wurde das zu zählende Gemisch 20 min. (Sedimentation) vor Beginn der Zählung in den Tracerlab gestellt. Es wurden mindestens 1000 Ipm gezählt, auf dpm korrigiert, wobei zur Quenckorrektur die Kanalverhältnismethode angewendet wurde.

#### 1.8. Proteinbestimmung:

Die Proteinbestimmung der untersuchten Proben erfolgte nach dem von LOWRY (1951) beschriebenen Verfahren mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz. Die Proben wurden 1½ bis 2 h nach Reagenzzugabe im Zeiss Spektrophotometer PMQ II bei 750 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen, in dem die gleiche Menge an verwendetem Puffer wie in den Proben enthalten war.

Die Extinktionswerte ergaben mit Hilfe einer Eichkurve aus kristallisiertem Rinder-Serumalbumin die gesuchten Proteinmengen.

Störungen durch Salze oder andere Substanzen (BONITATI 1969) wurden umgangen durch Verdünnung, bzw. durch Ermitteln des Salzgehalts der zu untersuchenden Probe mit einem Leitfähigkeitsmessgerät (Fa. Puls/München). Aus einer Eichkurve wurde der Salzgehalt abgelesen und der Leerwert der Proteinbestimmung auf die ermittelte Konzentration gebracht. Man konnte so einen eventuellen optischen Fehler gegenüber einem normalen Leerwert ermitteln und den gefundenen Wert korrigieren. Meist war jedoch der Proteingehalt von Ammonsulfatsuspensionen so hoch, daß nur sehr geringe Proben volumina (5 µl) benötigt wurden, sodaß Korrekturen nicht erforderlich waren.

## 2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION:

2.1. Enzymtest: Nach der Methode des gekoppelten optischen Tests, angelehnt an die Testangaben von FREEDLAND (1964) bei der Rattenleber, wurden für die L-SDH\* beim Fluschkrebs durch Variieren von pH u. Konzentration verschiedener Puffer, von Pyridoxalphosphat (0,01-0,12 mM), von LDH u. NADH (siehe Abschn. 1.4.), von Substrat, sowie durch Weglassen oder Zugabe von Substanzen folgende Endkonzentrationen in 1ml (bzw. 2ml) Küvetteninhalt als optimal ermittelt:

|                            |                       |
|----------------------------|-----------------------|
| Kaliumboratpuffer pH 8,3** | 100 mM                |
| EDTA                       | 0,5 mM                |
| Pyridoxalphosphat          | 0,1 mM                |
| NADH                       | 0,5 mM                |
| LDH                        | 12,5 $\mu\text{g/ml}$ |
| L-Serin                    | 70,6 mM               |

+ verschiedene Mengen Enzym, in 1,2 % KCl oder 0,04 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 gelöst. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit 1,2 % KCl konstant gehalten.

Für die Krebs-TDH\* (Bezeichnung siehe Einleitung) wurden, angelehnt an die Testangaben von VANQUICKENBORNE (1968) bei Clostridium tetanomorphum, in gleicher Weise wie oben folgende Endkonzentrationen in 0,4ml Küvettenvolumen als optimal ermittelt:

|                                 |                     |
|---------------------------------|---------------------|
| Kaliumphosphatpuffer pH 8,0**   | 100 mM              |
| ADP                             | 2,65 mM             |
| Pyridoxalphosphat               | 0,1 mM              |
| Dithioerythrit (Dithiothreitol) | 11,5 mM             |
| NADH                            | 0,5 mM              |
| LDH                             | 1 mg pro Testansatz |
| L-Threonin                      | 420 mM              |

+ verschiedene Mengen Enzym, in 1,2 % KCl oder in 0,04 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, jeweils enthaltend 0,1-0,2 mM Pyridoxalphosphat (abhängig von Reinigungsschritt u. -grad des Enzyms).

Bei beiden Tests wurde eine Minute nach Substratstart gemessen.

\*:ermittelt an Organextrakten von Adr. Zusätzliche Messungen wurden an Extrakten anderer Organe, bzw. am gereinigten Enzym vorgenommen. Bei Messungen am gereinigten Enzym wurde einetw. Kaliumboratpuffer pH 8,2 verwendet, siehe "Reaktionskinetik".

\*\* : bei anderen pH-Werten wurden niedrigere Aktivitäten gemessen, nennenswerte Aktivität ist v. pH 7,5-8,5 (SDH), bzw. -8,1 (TDH) vorh. Auf eine graph. Darstellung kann hier verzichtet werden, da sie der des gereinigten Enzyms (Abb. 6) entspricht (geringfügige Verschiebung der pH-Kurve).

## 2.2. Reinigung der L-Serin (Threonin) Dehydratase aus Antennen- drüsen von Orconectes limosus:

Der Trennungsgang wurde mit verschiedenem Ausgangsmaterial mehrmals ausgeführt und erwies sich als reproduzierbar. Meist wurden Tiere im Zwischenhäutungsstadium C<sub>4</sub> verwendet, es ergaben sich jedoch auch mit andern Zwischenstadien, gleich, ob man die Geschlechter trennte oder nicht, ob man frisch gefangene oder gehälterte Tiere gleich wessen Ernährungszustands nahm (siehe Versuche "Induktion") die gleichen Ergebnisse.

Für die Enzymreinigung sind von verschiedenen Autoren Acetonefällung (NAKAGAWA 1967), Hitzedenaturierung (KATSUNUMA 1971), Hydroxylapatit- (MORIKAWA 1974), sowie DEAE-Cellulose-Chromatographie (WHITELEY 1966 u. die vorgenannten Autoren) empfohlen worden. Mit Säure-, Aceton- und Hitzefällung wurde das Krebsenzym irreversibel denaturiert. Mit DEAE-Cellulose und Hydroxylapatit konnten zwar Reinigungen (drei-, bzw. 3,5-fach) erzielt werden, jedoch waren die Verluste\*, auch im Batch-Verfahren, so hoch (Denaturierung durch zu hohe Salzkonzentrationen zum Ablösen des Enzymproteins vom Trägermaterial, oder zu lange Verweildauer), daß der Reinigungseffekt fast aufgehoben wurde.

Da das Enzym sehr empfindlich war gegenüber Verdünnung (ein 4% Rohhomogenat-Extrakt enthielt nur 40% der spezifischen Aktivität eines 10% Rohhomogenat-Extraktes) und vom Zeitfaktor sehr abhängig war (bei Lagerung bei 4°C im Kühlschrank 30% Aktivitätsverlust in 20 h beim Rohextrakt, über 50% Verlust in 8-10 h beim gereinigten Enzym), mußte eine Reinigungsmethode gefunden werden, die schonend und in kurzer Zeit durchgeführt werden konnte. Die Fällung des Enzyms mit Ammonsulfat und anschließende Gelchromatographie über Sephadex G200 ergab die beste Reinigung, ein an die Gelchromatographie anschließender Trennungsversuch mit Hydroxylapatit brachte außer hohen Enzymverlusten keine Aktivitätserhöhung. Die Ergebnisse des Trennungsgangs sind in Tab. 1 dargestellt.

Die Ammoniumsulfatfällung erfolgte durch sukzessive Zugabe des Salzes nach dem von DiJESO (1968) veröffentlichten Nomogramm, unter Rühren bei 0°C und Konstanthaltung des pH bei 7,2, zur Enzymlösung.

---

\*: auch durch die nach Enzymkonzentrierung [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ↓] notwendige Dialyse bei 4°C.

Die Gelchromatographie erfolgte an Sephadex G200, welches nach der von DETEMANN (1967) angegebenen Methode in eine Trennsäule 2,6 x 33 cm gefüllt wurde. Das Gel war aquilibriert und wurde eluiert mit 0,04 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 enthaltend  $10^{-5}$  M Pyridoxalphosphat. Die Durchflusgeschwindigkeit des Puffers betrug 11 ml/h.

Im LKB Combi Cold Rac-Chromatographieschrank wurde das Eluat durch einen LKB Uvicord II mit angeschlossenen Schreiber bei 254 nm auf seine Lichtdurchlässigkeit hin überprüft und in 4 ml-Fractionen mittels eines LKB Ultrarac automatisch gesammelt. Wie bei der Ammoniumsulfatfraktionierung erreichte man durch die Gelfiltration eine vier- bis fünffache Reinigung.

Trennungsgang: (Ausgangsmaterial: 450 Antennendrüsen, 16g Frischg.)

|            |                                                                                                                                                   |                                     |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
|            | 10% Rohhomogenat in 1,2% KCl<br>enth. $10^{-4}$ M Pyridoxalphosphat,<br>$10^{-4}$ M Dithioerithryt,<br>Zentrifugation b. 21 000 g                 | Sediment<br>verworfen               |
| Überstand: | Fällung bei 23% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung,<br>Zentrifugation bei 21 000 g                                                           | Sediment<br>verworfen               |
| Überstand: | Fällung bei 38 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung,<br>Zentrifugation bei 21 000 g                                                          | Überstand<br>verworfen              |
| Sediment:  | Lösung in 0,04 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5<br>enth. $10^{-4}$ M Dithioerithryt,<br>$10^{-5}$ M Pyridoxalphosphat,<br>Zentrifugation b. 21 000 g | Sediment<br>verworfen               |
| Überstand: | Gelchromatographie an Sephadex G200                                                                                                               | Fractionen ohne S(T)DH<br>verworfen |

S(T)DH-enthaltende Fractionen Gefriertrocknung

Tab.1: Reinigung der L-Serin (Threonin) Dehydratase von *Oreconectes limosus*

| Reinigungsstufe               | Gesamtprotein<br>(mg) | Gesamtaktivität<br>(U) | SDH   | TDH    | Spezifische Aktivität (mU/mg Protein) | SDH | TDH | Aus- <sup>1)</sup> beute (%) |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------|-------|--------|---------------------------------------|-----|-----|------------------------------|
| Rohhomogenat                  | 2850                  | 436 130                | 4 430 | 125,0  | 1,55                                  |     |     | 100                          |
| 21 000 g Überstand            | 2830                  | 330 170                | 2 470 | 324,0  | 2,42                                  |     |     | 75                           |
| Ammoniumsulfat-fällung 25-38% | 60                    | 84 710                 | 1 730 | 1411,2 | 28,75                                 |     |     | 20                           |
| Sephadex G 200                | 5,2                   | 21 210                 | 275   | 4048,1 | 58,80                                 |     |     | 4                            |

<sup>1)</sup> bezogen auf SDH; TDH ab 21 000 g Überstand jeweils mit <sup>1</sup>/3 geringerer Ausbeute

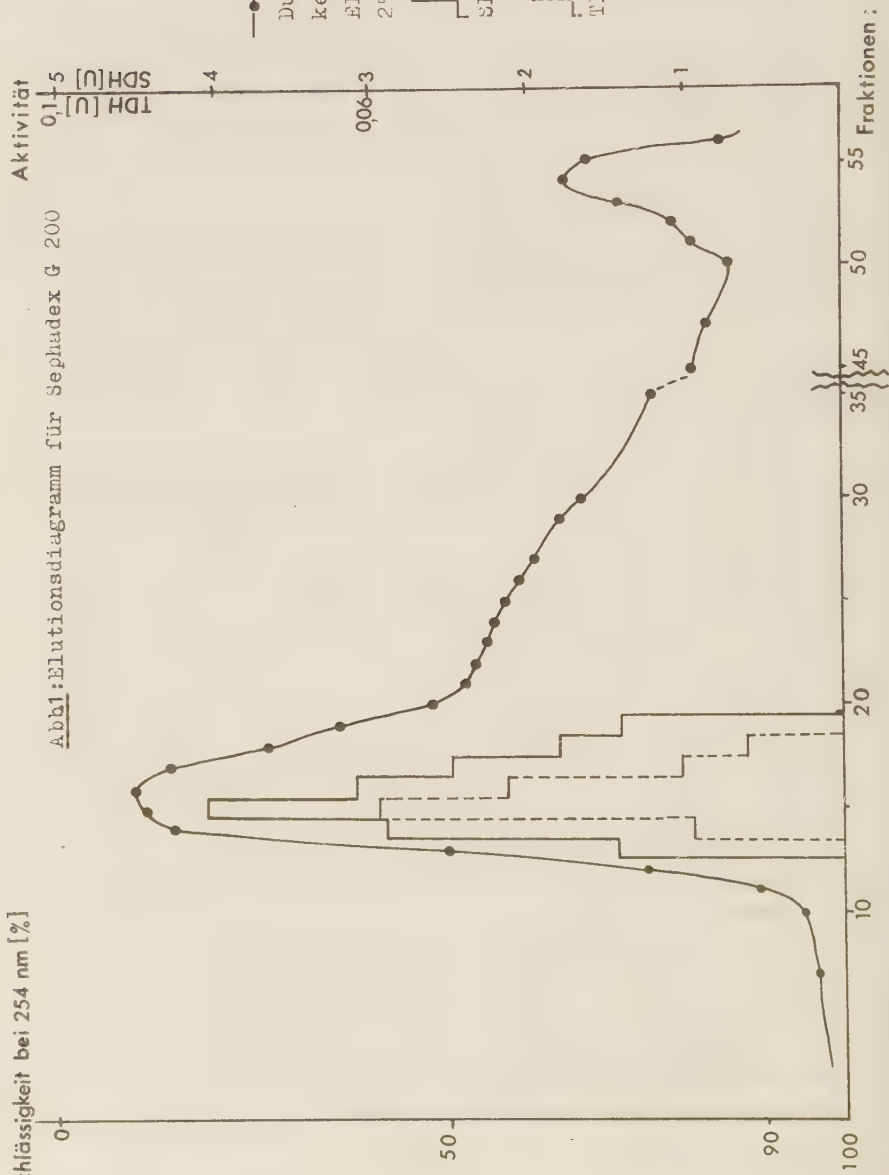
Die in der Delta I (Fa. Christ/Osterode) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefriergetrockneten gereinigten Enzympräparationen wurden luftdicht verschlossen und bei  $-25^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, wobei ein Verlust von 15-20 % eintrat. Bei Bedarf wurden die Enzymproben in 0,004 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, enthaltend  $2 \times 10^{-5}\text{ M}$  Pyridoxalphosphat, sowie  $10^{-5}\text{ M}$  Dithioerithryl, gelöst.

Die in Abb.1 dargestellte Elution an Sephadex G 200 und die dort ebenfalls dargestellte Verteilung der Enzymaktivitäten im Eluat war nicht nur an diesem Gel (reproduzierbar) durchführbar, sondern auch an Sephadex G 100 - wenn auch mit geringerem Reinigungsgrad. Stets erschien das Enzym im ersten großen Proteinpeak zu Beginn der diesem zuzuordnenden Fraktionen. Die aktivste Fraktion gegenüber L-Serin enthielt auch die höchste L-Threonin Dehydratase Aktivität, vergl. dazu die Stufenmuster der beiden Enzymaktivitäten unter dem ersten Proteinpeak in Abb. 1!

Der Umstand, daß das Enzym wenige Fraktionen nach dem mit BLUE DEXTRAN (MG: 2 000 000) ermittelten Leervolumen im Eluat erschien, ließ auf ein hohes Molekulargewicht oder eine Aggregation mehrerer Enzymeinheiten im Verlaufe des Reinigungsgangs schließen. Zu einer Klärung dieses Problems existieren verschiedene Möglichkeiten: man kann eine Enzymlösung mit Reagenzien versetzen, was eine Trennung in kleinere Einheiten ermöglicht, diese voneinander trennen und ihre jeweilige Aktivität bestimmen; weiterhin kann man in bestimmten Fällen eine diskoelektrophoretische Analyse mit enzymespezifischer Färbung anschließen; beides war in diesem Fall nicht möglich, da das Enzym sehr empfindlich war (so wäre bei den vorherigen Verfahren keine Messung einer Enzymaktivität möglich gewesen) und eine spezifische Anfärbemethode nicht existierte. Problem-Hilfestellung können folgende Verfahren bieten: a) die diskoelektrophoretische Analyse, wobei man an bestimmten Stellen das Enzym zu eluieren versucht, um evtl. unterschiedliche Eigenschaften festzustellen (s. 2.4.), b) die Ermittlung der Affinität des Enzyms zum Coenzym, denn bei zwei verschiedenen Enzymformen könnten Unterschiede in der Affinität auftreten (s. 2.5.), c) die Anwendung einer Trenn-

Durchlässigkeit bei 254 nm [%]

Abb 1: Elutionsdiagramm für Sephadex G 200



methode, die sowohl für das gereinigte wie das ungereinigte Enzym anwendbar ist und außerdem Aufschluss über das Molekulargewicht gibt, so z.B. die Gel-Chromatographie. Von diesen letzten drei Möglichkeiten wurde in dieser Arbeit zuerst die der Gel-Elution an Sephadex G200 angewendet. Auf eine kleine Säule (1x7 cm) wurde nach einem Trennungsgang für eine kleinere Menge Enzym nach längerem Nachwaschen bei konstanter Laufgeschwindigkeit Konextrakt aufgetragen. Das Enzym des Konextrakts hatte das gleiche Elutionsvolumen wie das gereinigte Enzym. Daraus läßt sich folgern, daß zumindest während des Reinigungsgangs der Ammonsulfatfällung kein Zerfall oder eine Aneinanderlagerung der Enzymmoleküle stattfindet.

## 2.3. Identifizierung der L-Cystathionin- $\beta$ -Synthase und deren Beziehung zur SDH.

Nachdem SELIM (1959) und NAGABHUSHANAM (1965) der SDH (aus Rattenleber) auch die Eigenschaften einer Cystathionin Synthase (CYSS) zugeschrieben hatten, war es für das Krebsenzym erforderlich, CYSS-Aktivität festzustellen und dann die Beziehung v. CYSS und SDH zueinander zu überprüfen.

### 2.3.1. Identifizierung und Abtrennung von L-Cystathionin:

Erster Nachweisversuch der L-Cystathionin Synthase.

Ein Ammoniumsulfatniederschlag (45%) von 1,8 g Antennendrüsen (Frischgewicht) wurde in 0,1M MP-Puffer pH 7,5 eine Stunde lang dialysiert. 2ml der dialysierten Probe (SDH-Aktivität: 158,6mU) wurden für den CYSS-Test benutzt. Der Enzymtest wurde, angelehnt an die Angaben von BROWN (1966) und NAGABHUSHANAM (1965), in 3ml Gesamtvolumen bei folgenden Endkonzentrationen durchgeführt:

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Kaliumboratpuffer pH 8,3 | 100 mM  |
| EDTA                     | 0,05mM  |
| Pyridoxalphosphat        | 0,067mM |
| L-Serin                  | 66,67mM |
| DL-Homocystein           | 83,33mM |

Außer den 2ml Enzymlösung wurden ~12 $\mu$ l L-Serin C-14 (U), einer Lösung von 160 mCi/mM  $\cong$  1  $\mu$ Ci im Testansatz, zugegeben. Diese Mischung wurde 30 min. bei 37°C unter Durchströmen mit N<sub>2</sub> inkubiert. Diese 3ml Testgemisch enthielten 2,5x10<sup>5</sup> dpm. Die Reaktion wurde durch Erhitzen für 3 min. bei 100°C beendet und der Pro-

teinniederschlag 10 min. bei 5000 g abzentrifugiert. 2ml Überstand ( $\approx 1,7 \times 10^6$  dpm) wurden für die AS-Auftrennung verwendet. Nach Eindampfen im Rotavapor und Aufnehmen in 0,5ml 0,2M Na-Citratpuffer pH 2,2 wurde die Probe auf eine Dowex-Säule aufgetragen (siehe 1.6.). Die 5ml-Fractionen wurden auf AS- u. C14-Gehalt überprüft. Nachdem so mit dem Dowex-Verfahren beim Leerwert (Enzymtestlösung ohne Enzym) und an einer gereinigten SDH (Aktivität 1,8U) keine CYS-Bildung nachzuweisen war, konnte bei dem durch (45%)  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ -Fällung angereicherten Enzym in der den CYS-"Gipfel" enthaltenden Dowex-Fraktion etwas höhere Radioaktivität nachgewiesen werden (100 lpm über dem Wert der vorangehenden Fraktion, aber über 100 lpm unter dem der nachfolgenden Fraktion, die kein CYS enthielt). Eine Rechromatographie des CYS-Gipfels an Dowex 50 und anschließender Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (Butanolgemisch) ergab, daß an der mit Ninhydrin als CYS nachgewiesenen Stelle die Radioaktivität zwar höher war als allgemein, an anderer Stelle unterhalb des Farbflecks gleich hoch war (3000:3100 lpm), sodaß eine exakte Aussage über Quantität und Enzymaktivität nicht möglich war.

Zweiter Nachweisversuch der L-Cystathionin Synthese.

Die Methodik des 1. Nachweisversuchs wurde bis zum Enzymtest wiederholt, jedoch mit der Modifikation, daß 60  $\mu$ l L-Serin C-14 (U)  $\approx 5 \mu$ Curie eingesetzt wurden und 1 h bei 25°C inkubiert wurde. Dann wurde wie oben bis zur Aufnahme in Citratpuffer pH 2,2 weiterverfahren, von dessen Gesamtvolumen von 0,5ml (enthaltend 3,7  $\mu$ Ci  $\approx 8206000$  dpm) 30  $\mu$ l abgenommen und auf die Säule (69  $\times$  0,9 cm) des Unichrom zusammen mit dem AS-CYS-Eichgemisch aufgegeben wurden. Serin erschien zu Beginn, CYS gegen Ende der Elution. Entscheidend war die Abtrennung einer ninhydrin-positiven wie auch radioaktiven Verbindung, die sich nicht-enzymatisch gebildet hatte (nachgewiesen durch Unichrom-Auftrennung einer Leerwertprobe) und die beim Dowex-Verfahren die Basiswerte vor und hinter dem CYS-peak durch Verschleppung von Radioaktivität und Ninhydrinfarbarkeit verfälscht hatte. Bei der Unichromaauftrennung unterschieden sich diese Basiswerte nicht von der bei 570 nm registrierten Nulllinie (entsprechendes gilt für die gemessene Radioaktivität), sodaß dem CYS-peak bei der Rohextraktprobe (aber nicht mehr bei einer Probe gereinigten Enzyms) ein deut-

licher Radioaktivitätspeak zugeordnet werden konnte.

## 2.3.2. Ermittlung der spezifischen Aktivität der CYSS.

Dazu wurde die dem CYS-peak zugeordnete Aktivität auf die 0,5 ml Citratpuffer pH 2,2 hochgerechnet: 12000 dpm = 0,2 % der ursprünglichen Gesamtaktivität im Citratpuffer. Da dem Enzymtest ein Enzymgemisch, enthaltend 13,4mg Protein, sowie 200  $\mu$ Mol L-Serin zugesetzt worden waren, ergeben sich bei 0,2% Aktivitätsausbeute also 0,4  $\mu$ mol L-Serin- und entsprechend DL-Homocystein-Umsatz pro 60 Minuten u. 13,4mg Protein (bei 25°C, unter N<sub>2</sub>). Es ergibt sich also für die L-Cystatnionin Synthase eine spezifische Aktivität von  $\sim$ 1mU.

## 2.3.3. Beziehung zur SDH im Vergleich mit anderen CYSS.

Die spezifischen Aktivitäten anderer CYSS (alle bei pH 8,5 gemessen) sind bei der Ratte am höchsten: SELIM(1959) und KASHIWAMATA(1970) ermittelten bei Rohextrakten Aktivitäten von 25,8 bzw. 15 mU (auf die hier verwendete Einheit umgerechnet, jedoch bei 37°C), BROWN (1966) nach Acetonfällung 17 mU (37°C). Dabei ist die Aktivität der an den gleichen Präparationen gemessenen SDH nicht nur wesentlich größer (71-98 mU), sondern das Verhältnis der einzelnen CYSS-Werte zueinander unterscheidet sich total von dem der jeweils zugeordneten SDH's. MUDD (1965) fand in der Leber geschwulstkranker Menschen CYSS mit einer durchschnittlichen Aktivität von 1,8 mU (37°C). Das fast völlige Verschwinden dieser Aktivität (A. war um den Faktor 40 geringer) bei an Homocysteinurie erkrankten Menschen stand im Widerspruch zu einer gleichbleibenden Aktivität der parallel gemessenen TDH, sodaß verschiedene stoffwechsel-physiologische Wege für die Steuerung der beiden verglichenen Enzyme angenommen werden müssen. Es ist damit nach den biochemisch-immunologischen Beweisen, daß SDH bzw. TDH von CYSS verschiedene Enzyme sind (BROWN\* 1966, NAKAGAWA 1967, 1969), auch physiologisch bewiesen. So konnten FREEDLAND (1964) und ISHIKAWA (1965) - bei unveränderter CYSS - Aktivität - eine Aktivitätserhöhung der SDH induzieren. NAKAGAWA (1969) wies zugleich bei einer SDH-Induktion das Fehlen einer Beeinflussung der Homoserin Denhydratase nach, die bei vielen

\*:Er und KASHIWAMATA(1970) führen die Ein-Enzym-Hypothese v. SELIM(1959) u. NAKAGAWA(1965) auf die Unkenntnis zurück, daß  $\alpha$ -Ketosauren mit Homocystein Zusammenlagerungen (adducts) bilden.

CYSS-Fractionen auch nachgewiesen wurde. Die beiden Enzyme CYSS und Homoserindehydratase konnten beim Krebs nur im Rohextrakt (CYSS nach Konzentrierung) nachgewiesen werden, im Verlaufe der Reinigung findet also eine Abspaltung dieser Begleitenzyme von der SDH statt, wodurch die vorgenannten Autoren bestätigt werden.

## 2.4. Elektrophoretische Analyse des gereinigten Enzyms.

### 2.4.1. Vergleich verschiedener Enzymbanden.

Die diskelektrophoretische Analyse des gereinigten Krebsenzym an 7,5% Polyacrylamid-Gel ergab 2 Banden: Eine scharfe Bande, die ca. 1cm weit ins Gel gewandert war, sowie eine mehr verwaschene Bande, die nur wenige Millimeter weit ins Gel gewandert war. Auch bei Aufbringung höherer Mengen Enzymproteins auf das Gel -überschüssiges Protein blieb zu Beginn des Trenngels liegen-, sowie bei längerer und intensiverer Anfärbung mit Amidoschwarz 10B ergaben sich keine weiteren Banden.

Verschiedene Autoren haben bei diskelektrophoretischer Analyse des gereinigten Enzyms nur eine Proteinbande nachgewiesen, JOST (1968) bei der Ratte, KATSUNUMA (1971) bei der Bäckerhefe. Dagegen berichten andere von zwei Banden:

J.P. SIMON (1974) weist mit der Gelelektrophorese von mit "maleic anhydride" behandeltem Enzym zwei Banden nach: Eine scharfe Bande, die, analog dem Orconectes-Enzym, weiter gewandert und, bei Vergleich der Anfärbeintensität, eine höhere Menge Protein enthielt als die ebenfalls (s.o.) weniger bewegliche bzw. anfärbbare zweite Bande. Nach anschließender Ultrazentrifugationsanalyse spricht er der zweiten, langsameren Bande ein extrem hohes Molekulargewicht, auf Molekül-Aggregation beruhend, zu.

NAKAGAWA (1969) weist beim Rattenleberenzym mit Diskelektrophorese an Polyacrylamid-Gel zwar nur eine Bande nach, erzielt mit Stärkegel-Zonenelektrophorese allerdings zwei Banden, wovon die weiter wandernde Bande die weitaus stärkere Enzymaktivität gegenüber der geringen, auch wesentlich weniger Protein enthaltenden Bande mit schwacher Mobilität hatte.

INOUE (1971) bestätigt NAKAGAWA: Er erhielt bei Chromatographie an DEAE-Cellulose 2 Isoenzyme jeweils mit dem gleichen MG. Die kinetischen u. immunochemischen Eigenschaften beider SDH-Formen waren identisch, nur bei der Diskelektrophorese ergab jede Form

jeweils eine Bande an verschiedenen Stellen. Die MG-Bestimmung mittels Gelelektrophorese ergab für beide Formen je ein MG von 34000, sodaß sie nach INOUE als Untereinheiten eines Enzyms (MG~64000, ab. NAKAGAWA) aufzufassen sind. D. SIMON (1973) bestätigt INOUE in Bezug auf das MG der Untereinheiten, er konnte jedoch durch Gelchromatographie der verschiedenen Formen in Gegenwart von L-Serin und Messung des entstandenen Pyruvats nachweisen, daß das native Enzym, aus 2 Untereinheiten zusammengesetzt, bei einem MG von ~68000 die einzig aktive Form besitzt.

#### 2.4.2. Identifizierung d. Krebsenzymys bei d. Diskelektrophorese.

Nach einer wie üblich durchgeführten Diskelektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel schnell mittels eines Gelschneiders (analog einem Eierschneider gebaut) in 2,5 mm dicke Scheiben querschnitten. Diese Scheibchen wurden jede für sich mit einer möglichst kleinen Menge (0,1-0,5 ml) Serindehydratase-Testgemisch versetzt und in einem kleinen POTTER-ELVEJHEM-Gefäß mittels eines Teflonstempel-Homogenisators kurz suspendiert; dann wurde diese Mischung in eine Küvette überführt und wie üblich durch Substrat gestartet und gemessen. Nur in Höhe der scharfen Bande (s. 2.4.1., erster Absatz) konnte eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die andere Bande kann man zwar als ein Begleitprotein des Enzyms deuten. Da ein an den normalen Trennungsgang angeschlossener Trennversuch mit Hydroxylapatit (s. 2.2.) keine Veränderung ergab und bei der MG-Bestimmung (s. 2.6.) der einen Bande das doppelte MG der anderen zuzuschreiben ist, läßt sich daraus durchaus eine nähere Beziehung der beiden Banden zueinander ableiten (siehe 2.6.).

INOUE konnte durch Proteinolat bzw. Hydrocortisongabe eine SDH-Form gegenüber der anderen bevorzugt induzieren und dies während der Reinigung bzw. bei der diskelektrophoretischen Analyse feststellen. Für das Orconectes-Enzym ist zu sagen, daß es während der Reinigung sich einheitlich verhielt, nur bei der Diskelektrophorese traten 2 Banden auf und zwar unabhängig vom Ausgangsmaterial der Reinigung: Auch bei Krebsen mit hungerinduzierter SDH waren die diskelektrophoretischen Eigenschaften, Anfärbeintensität der jeweiligen Bande, oder Abstand der Banden voneinander unverändert gegenüber den Werten bei normal gefütterten Tieren.

## 2.5. Bestimmung der Affinität des Enzyms zu Pyridoxalphosphat:

Um die Dissoziationskonstante des Coenzyms zu bestimmen war zuerst eine völlige Abtrennung von Pyridoxalphosphat vom Enzymprotein erforderlich, dann konnte durch Zugabe von Pyridoxalphosphat die Aktivität des Apoenzyms sukzessive wiederhergestellt werden (Abb.3 u. 4). Angelehnt an die bei NAKAGAWA (1969) angegebene Methode wurde eine Probe des Enzyms in 0,02 M Kaliumphosphatpuffer, enthaltend  $10^{-5}$  M Pyridoxalphosphat, bei pH 7,5 gelöst.

Ein Teil davon wurde für Vergleichsmessungen abgezweigt, der andere Teil wurde unter Rühren bei 0° C in dünner Schicht gegen 0,02 M Kaliumphosphatpuffer, enthaltend  $10^{-2}$  M L-Cystein, dialysiert. Gegen diesen Puffer wurde 26 Stunden bei einmaligem Pufferwechsel dialysiert. Dann wurde gegen den gleichen Puffer, jedoch ohne L-Cystein, für 15 1/2 h unter Pufferwechsel dialysiert.

Das nach dieser Prozedur inaktive Enzym konnte durch Pyridoxalphosphat-Zugabe wieder völlig aktiviert werden (verglichen mit der abgezweigten Probe). Die Abhängigkeit der Enzymaktivität ( $\Delta E$ ) von der Pyridoxalphosphat-Konzentration im doppelt reziproken plot ( $\frac{1}{\Delta E} / \frac{1}{PP}$ ) ist in Abb.3 wiedergegeben. Hieraus läßt sich die Dissoziationskonstante der Serindehydratase gegenüber Pyridoxalphosphat ermitteln. Beim Krebsenzym konnte als Dissoziationskonstante von  $4,7 \times 10^{-5}$  M nachgewiesen werden. Dieser Wert liegt etwas höher als der bei der Hefe (KATSUNUMA 1971) gefundene Wert von  $3 \times 10^{-6}$  M und dem der Rattenleber von  $3,7 \times 10^{-7}$  M (NAKAGAWA 1969). Jedoch fand HOSHINO (1972) bei der Rattenleber Werte von  $7-50 \times 10^{-5}$  M, zurückzuführen auf unterschiedliche Salzkonzentrationen u. ä. während der Messungen. Offensichtlich variieren die ge-

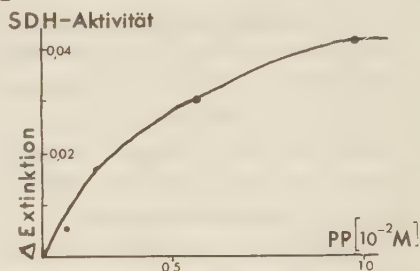


Abb.4: Einfluss der Pyridoxalphosphatkonzentration auf die Wiederherstellung der Apo-Serindehydratase Aktivität.

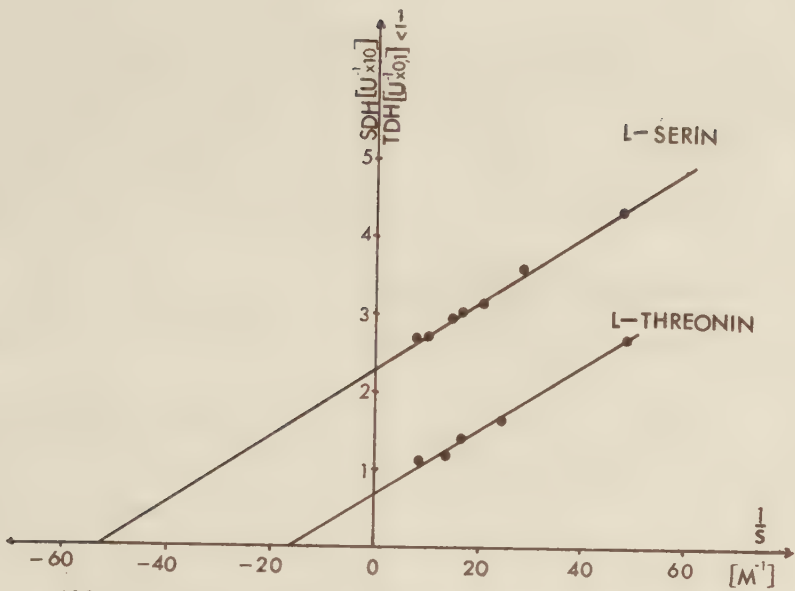


Abb. 2 : Ermittlung der Michaeliskonstanten

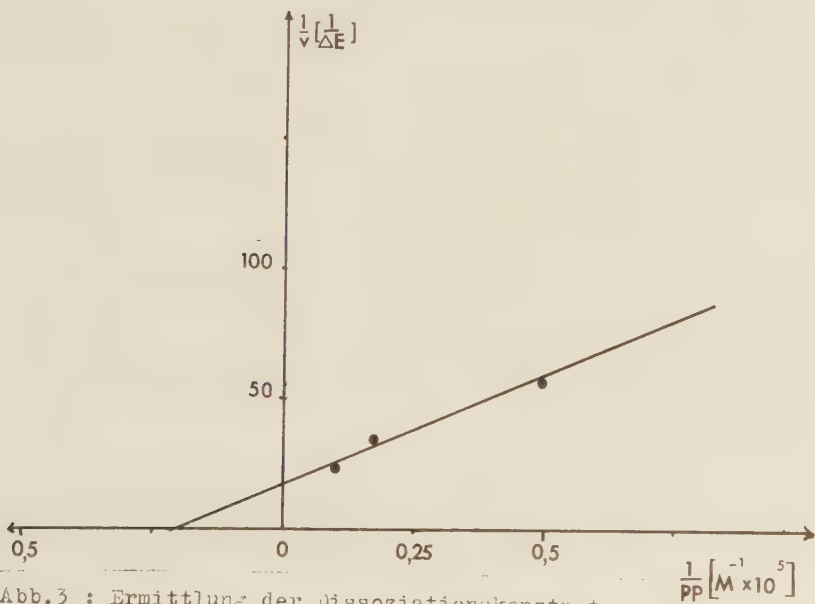


Abb. 3 : Ermittlung der Dissoziationskonstante von Pyridoxalphosphat

gefundenen Dissoziationskonstanten d. Coenzym<sub>s</sub> je nach Herkunft und selbst innerhalb einer Spezies sehr stark, analog den gefundenen Molekulargewichten (siehe Tab.2). Vielleicht spielen unbekannte Aktivatoren eine Rolle, das Enzym ist jedenfalls in einigen Fällen von Aktivatoren abhängig, in einem Fall Pyridoxalphosphat-unabhängig (COHN 1974, bzw. Tab.4).

## 2.6. Molekulargewichtsbestimmung:

Bei der Gelchromatographie an Sephadex G 200 konnte man bereits feststellen, daß das Enzym kurz nach dem Leervolumen im Eluat auftauchte.

Aufgrund der an Rattenleber u. a. festgestellten Molekulargewichte (MG) (siehe Tab.2) nahm ich an, daß sich das Enzym entweder während der Präparation oder im Verlauf der Reinigung entfaltet hatte, oder daß sein MG tatsächlich so hoch war. Es galt also eine MG-Bestimmung mit einer Methode durchzuführen, die von der Form des Enzymproteinmoleküls weitgehend unbeeinflusst blieb.

Nach der Methodik von SHAPIRO (1967) und HEDRIK (1968) wurde die MG-Bestimmung mittels Disk-Gelelektrophorese<sup>+</sup> durchgeführt, es wurde das System MAURER (1968) bei pH 8,3 angewendet (Anodisches Puffersystem Nr.1 / Trennung bei pH 9,5). Als Eichproteine wurden Ovalbumin (45 000), Albumin (67 000), Aldolase (147 000), Katalase (240 000) der Firma Böhringer/Mannheim, sowie Apoferritin (460 000) der Firma Calbiochem verwendet.

Es wurde bei Gelkonzentrationen von 7,5%, 6%, u. 4,5% der  $R_m$ -Wert der getesteten Proteine ermittelt (Wanderstrecke des jeweiligen Proteins zur Gellänge). Die Punkte von  $\log R_m$  über der Gelkonzentration aufgetragen ergaben für jedes Protein eine Gerade, deren Steigung charakteristisch

---

in Glasröhrchen von 2,8 mm  $\varnothing$  und einer Gellänge von 10 cm Trennung bei 360 - 380 V u. 0,85 mA pro Gelröhrchen in 3 - 3½ Stunden. Nach erfolgter Elektrophorese rasche u. unversehrte Entnahme der Gele. Sonst siehe Material u. Methoden.



Abb. 5: Molekulargewichtsbestimmung

- Ovalbumin
- ▼ Albumin
- ◇ Aldolase
- ◆ Katalase
- ▲ Apoferritin

die Pfeile kennzeichnen die Werte, die den Proteinbanden des Enzyms entsprechen  
 = Bande mit nachgewiesener Enzymaktivität

für das MG war. Trug man nun die Steigungen der Eichproteine (=slope) über die dazugehörigen MG auf, so konnte man auf der resultierenden Eichgeraden mittels der Steigung des Enzymproteins das MG des Enzyms ablesen (Abb.5).

Das Enzym zeigte bei allen getesteten Gelkonzentrationen zwei Banden. Der einen Bande war ein MG von 290 000, der anderen - mit hinsichtlich der Größe des MG, Grenze der Methode (HEDRIK 1968) größerem Fehler behaftet, ein MG von 582 000 zuzuordnen, (siehe Pfeile in Abb.5).

Es scheint, daß Moleküle des Krebsenzym während der Präparation und auch im Verlauf des Reinigungsgangs mit jeweils einem anderen Enzymmolekül aggregieren können, sodaß ein Gebilde mit einem MG entsteht, wie es der zweiten Bande zugeordnet wird. Dabei büßt das Enzym in seiner aggregierten Form Aktivität ein. Jedenfalls konnte in der vorner beschriebenen diskoelektrophoretischen Analyse nur in Höhe der ersten Bande Aktivität festgestellt werden. Welchen Kriterien diese Aggregation zugeschrieben werden kann, bedarf der Klärung. Eine Erklärung ist vielleicht die während Präparation und Trennungsgang erfolgte Pyridoxalphosphatzugabe zur Verhinderung einer Inaktivierung des Enzyms.

Ein Vergleich der MG von L-Serin (Threonin) Dehydratasen unterschiedlicher Herkunft (siehe Tab. 2) offenbart eine hohe Variationsbreite selbst innerhalb einer Spezies. Die MG von Mikroorganismen kommen dem hohen MG des Krebsenzym nahe, Untereinheiten des Enzyms konnten INOUE (1971) und D.SIMON (1973) bei der Rattenleber, sowie WHITELEY (1966) und J.P. SIMON bei *Clostridium tetanomorphum* nachweisen. Beim Rattenleberenzym ist eine Variationsbreite des MG von 20 000 (NAGABHUSHANAM 1964) bis über 200 000 (HOSHINO 1971) möglich. HOSHINO (1969b) konnte bei der Rattenleber unterschiedliche MG beim induzierten "SD-A" und nicht-induzierten Enzym "SD-B" feststellen. Dies ist beim Krebsenzym auszuschließen (siehe 1. Absatz im Abschnitt "Reinigung"). 1971 konnte HOSHINO sein "SD-B" -Enzym in "SD-B<sub>2</sub>"- und "SD-B<sub>1</sub>"-Einheiten mit weit höherem Gewicht als die Ausgangs-

Vergleich der Molekulargewichte v. L-SDH bzw. L-TDH unterschiedlicher Herkunft (TABELLE 2):

| Herkunft                                                     | Molekulargewicht                                                | Bestimmungsart                                            | Autor                           |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Schafleber                                                   | 98000=41000+47000                                               | Bio-gel A1,5; Sephadex G200<br>analyt. Diskelektrophorese | KAPKE (1975)                    |
| Kattenleber                                                  | 20-21000                                                        | Sedimentationsgleichgewicht<br>Sucrosedichtegradient      | NAGABHUSHANAM (1964)            |
| "                                                            | 42-43000                                                        | Sephadex G100, Sucr. grad.                                | HOSHINO (1969) a                |
| "                                                            | 63500                                                           | Sediment. äq.                                             | NAKAGAWA (1967)                 |
| "                                                            | 64000                                                           | Sediment. äq.                                             | SUDA (1971)                     |
| Kattenleber                                                  | 60-68000=2x34000                                                | Sephadex G100, Sucr. grad.                                | SIMON, D. (1973) / INOUE (1971) |
| Kattenleber: nicht-induz.<br>" : induziert                   | 80000 "SD-B"<br>42000 "SD-A"                                    | Sephadex G100                                             | HOSHINO (1969) b                |
| " : Auftrenng. v. "SD-B"<br>über 200000 "SD-B <sub>1</sub> " | 180000 "SD-B <sub>2</sub> "<br>über 200000 "SD-B <sub>1</sub> " | Sephadex G200, Sucr. grad.                                | HOSHINO (1971)                  |
| Urconectes limosus                                           | 290000                                                          | analyt. Diskelektrophorese                                | diese Arbeit                    |
| Bacterium subtilis                                           | 200000                                                          | Sediment. äq.                                             | HATFIELD (1970)                 |
| Bäckerhefe                                                   | ~180000                                                         | Sediment. äq.                                             | KATSUNUMA (1971)                |
| Escherichia coli                                             | 147000                                                          | Sediment. äq.                                             | SHIZUTA (1969)                  |
| Salmonella typhimurium                                       | 194000                                                          | Sediment. äq.                                             | ZARLENGO (1968)                 |
| Clostridium acidurici                                        | 72000                                                           | Sephadex G200                                             | SAGERS (1971)                   |
| Clostr. tetanomorphum                                        | 160000                                                          | Sediment. äq.                                             | VANUITKEN BORNE (1968)          |
| Clostr. tet.                                                 | 160000, dissoz. in<br>122000, 63000, 40000                      | Sephadex G100/150, sowie<br>Sediment. äq.                 | WHITELEY (1966)                 |
| Clostr. tet.                                                 | 184000=4x 46000                                                 | Sediment. äq.                                             | SIMON, J.P. (1974)              |

fraktion aufteilen, wobei die "SD-B<sub>2</sub>"-Fraktion hauptsächlich L-Homoserin Dehydratase aufwies. Die "SD-B<sub>1</sub>"-Fraktion mit ihrem hohen MG wies nur L-Serin Dehydratase Aktivität auf, war sehr empfindlich und instabil, ähnlich wie beim Krebsenzym.

Die unterschiedlichen MG des Enzyms, in TAB.2 dargestellt, sind wohl hauptsächlich auf phylogenetische Vielfalt und wohl kaum auf eventuelle unterschiedliche Fehler der verschiedenen MG-Bestimmungsmethoden zurückzuführen. Zu einer Fehlerdiskussion der beim Krebsenzym verwendeten Methode ist zu sagen, daß bei allen Diskelektrophoresen die eine Enzymbande (290 000) bei allen Gelkonzentrationen scharf und auf den Millimeter genau kam, die andre Enzymbande war auf 2-3 mm verteilt, ihre Front kam ebenfalls genau. Diese Genauigkeit ist wohl aufgrund der verwendeten, wie bei HEDRIK (1966) angegebenen, niedrigen Gelkonzentrationen möglich. Der Fehler der graphischen Darstellung bleibt innerhalb der von HEDRIK angegebenen und auch bei anderen MG-Bestimmungsmethoden üblichen Grenzen von 5-10 %.

## 2.7. Reaktionskinetik:

### 2.7.1. Puffersysteme und pH-Optima:

Beim Krebsenzym hatte sich während der Reinigung Kaliumphosphatpuffer, enthaltend  $10^{-5}$ M Pyridoxalphosphat als günstig erwiesen. Dieser Puffer eignet sich auch zur Bestimmung von Enzymaktivitäten im optischen Test. Da bei Rohextraktmessungen ein pH-Optimum von 8,0 bei der TDH, ( in Kaliumphosphatpuffer) und eines von 8,3 bei der SDH ( in Kaliumboratpuffer) ermittelt wurde, wurden in diesen Puffern die Enzymaktivitäten bestimmt (siehe optischer Test).

In den beiden oben genannten Puffern (Endkonzentration: 0,1 M) wurden auch die pH-Optima des gereinigten Enzyms, in Abhängigkeit von dessen Aktivität gegen L-Serin bzw. L-Threonin, ermittelt (siehe Abb. 6).

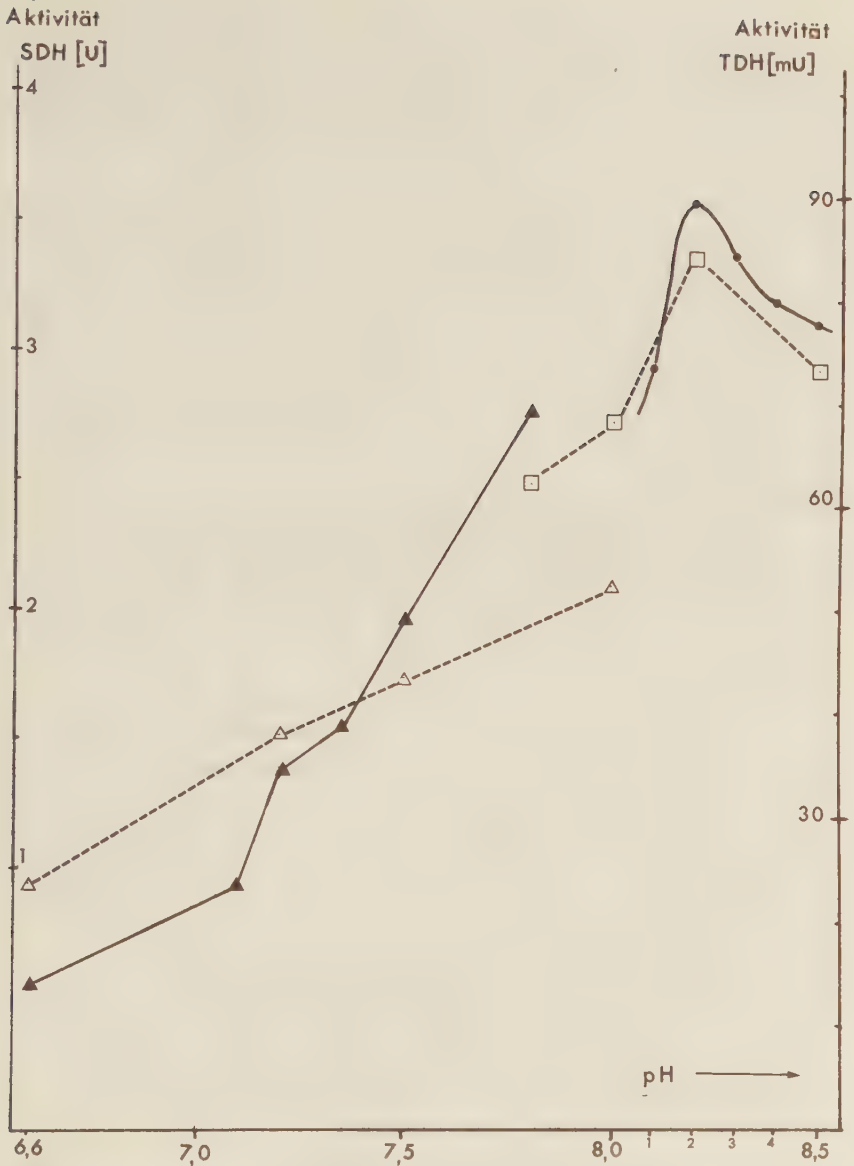


Abb.6: pH-Optima der L-Serin Dehydratase

SDH:



Kaliumphosphatpuffer 0,1 M



Kaliumboratpuffer 0,1 M

TDH:



Für beide Enzymaktivitäten wurde in Kaliumboratpuffer ein pH-Optimum bei 8,2 gemessen\*. Durch Verdünnung des Enzyms oder durch Herabsetzung der Substratkonzentration (MORIKAWA 1974) konnte keine Verschiebung des pH-Optimums erreicht werden.

In Tab.3 sind die pH-Optima von Serin (Threonin) Dehydratasen unterschiedlicher Herkunft aufgeführt. Auch hier zeigt sich, wie beim unterschiedlichen MG, eine hohe Variationsbreite des Enzyms: Von einem pH-Optimum von 7,5 bei *Bacillus alvei* (GRIFFITHS 1970) bis zu einem Wert von 9-10 bei *Salmonella typhimurium* (BURNS 1968), allerdings bei verschiedenen Temperaturen. MORIKAWA (1974) erreicht durch Zugabe von  $Mg^{++}$ -Ionen eine Verschiebung des pH-Optimums mehr ins basische.

#### 2.7.2. Aktivatoren und allosterische Effekte:

Eine Aktivierung durch bestimmte Salze konnte nicht nachgewiesen werden.  $Na^{+}$ -,  $Mg^{++}$ -, und  $NH_4^{+}$ -Salze wirkten nicht nur nicht aktivierend, sondern ab Konzentrationen von 0,1 M sogar inaktivierend. Lediglich Kaliumsalze - als KCl oder Kaliumphosphatpuffer - konnten in höheren Konzentrationen ohne Aktivitätseinbuße verwendet werden.

Allosterische Effekte, - getestet wurden AMP, ADP, sowie ATP -, wie sie von einigen Autoren berichtet wurden, konnten beim Krebsenzym nur bei Messung von dessen Aktivität gegenüber L-Threonin ermittelt werden. Die TDH konnte nur durch ADP beeinflusst werden. Überhaupt war die TDH im Konhomogenat nur messbar, wenn ADP und Dithiothreitol (Dithioeritryl) anwesend waren, ohne ADP konnte nur ein Drittel der TDH-Aktivität gemessen werden.

Aktivierend wurden Salze bei der Schafleber (NISHIMURA 1961:  $K^{+}$ ,  $NH_4^{+}$ ; SAYRE 1956: Glutathion), bei *Clostridium acidurici* (SAGERS 1971:  $Fe^{++}$ ), bei *Bacterium alvei* (GRIFFITHS 1970:  $K^{+}$ ,  $NH_4^{+}$ ), sowie bei *Corynebacterium* sp. (MORIKAWA 1974:  $Mg^{++}$ ) angewendet.

---

\*:Die Messungen am gereinigten Enzym erfolgten also einheitlich mit diesem Puffer.

Tab. 3: pH-Optima verschiedener L-Serin (bzw. L-Threonin) Dehydratasen.

| Herkunft                  | pH-Optimum | Messpuffer          | Temp. | Autor                     |
|---------------------------|------------|---------------------|-------|---------------------------|
| Schafleber                | 8,5-9,0    | TRIS/Carbonat       | 37°C  | DAVIS (1962)              |
| "                         | 8,2-8,6    | K-Phosphatpuffer    | 37    | NISHIMURA (1961)          |
| Rattenleber               | 8,3        | Boratpuffer         | 37    | SUDA (1971)               |
| "                         | 8,3        | K-Boratpuffer       | 37    | NAGABHUSHANAN (1964)      |
| "                         | 8,4        | Na-Pyrophosph. puf. | 37    | HOSHINO (1969a)           |
| "                         | 8,3        | Phosphatpuffer      | 45    | GHAZARIAN (1973)          |
| Orconectes limosus        | 8,2        | K-Boratpuffer       | 25    | diese Arbeit              |
| Bacillus alvei            | 7,5        | K-Phosphatpuffer    | 37    | GRIFFITHS (1970)          |
| Bacillus subtilis         | 8,2        | K-Phosphatpuffer    | 0,1   | Raumtemp. HATFIELD (1970) |
| Bäckerhefe                | 8,0-8,3    | Triäthanolamin/HCl  | 0,1   | KATSUNUMA (1971)          |
| Clostridium acidurici     | 8,4        | K-Phosphatpuffer    | 0,1   | SAGERS (1971)             |
| Clostridium tetanomorphum | 9,6        | TRIS                | 0,2   | WHITELEY (1966)           |
| "                         | 8,0        | K-Phosphatpuffer    | 0,1   | VANQUICKENBONE (1968)     |
| "                         | 8,4        | TRIS                | 0,2   | NAKAZAWA (1967)           |
| Corynebacterium sp.       | 8,0-8,5    | TRIS/HCl            | 0,1   | MORIKAWA (1974)           |
| Escherichia coli          | 7,4        | K-Phosphatpuffer    | 0,1   | SHIZUTA (1969)            |
| Salmonella typhimurium    | 9-10       | TRIS                | 0,03  | BURNS (1968)              |

Die Inaktivierung des Enzyms bei Verdünnung führen D.SIMON (1973) sowie HOSHINO (1972) auf eine Dissoziation des Enzyms in seine Untereinheiten zurück, die aktivierende Rolle von  $\text{NH}_4^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen im Zusammenhang mit Pyridoxalphosphat deuten sie als einen dieser Dissoziation gegenläufigen Prozeß. (Beim Krebs wirken aber  $\text{K}^+$ , bzw.  $\text{NH}_4^+$ -Salze nicht aktivierend.

Effekte konnten durch AMP bei der Schafleber ( SAYRE 1956: nur bei Messung der Enzymaktivität gegenüber L-Serin) und bei Escherichia coli (SHIZUTA 1969) nachgewiesen werden, sowie durch ADP bei Clostridium tetanomorphum ( VAN-QUICKENBORNE 1968, NAKAZAWA 1967), wobei in einem Fall (WHITELEY 1966) ADP durch GDP oder IDP ersetzt werden konnte ( siehe Tab.4 ).

### 2.7.3. Spezifität des Enzyms:

Die Spezifität des Enzyms für die L-Form der Substrate war sehr hoch. Weder im Rohextrakt, noch beim gereinigten Enzym konnte Aktivität mit D-Serin oder D-Threonin nachgewiesen werden.

Im Rohextrakt können L-Homoserin (spezifische Aktivität ca. 10 mU im SDH-Test), sowie L-Cystathionin (s. 2.3.2.) umgesetzt werden, nicht jedoch beim gereinigten Enzym.

### 2.8. Kinetische Konstanten:

#### 2.8.1. Bestimmung der Michaeliskonstanten:

Ein Maß für die Umsatzgeschwindigkeit des Substrats durch das Enzym ist die Michaeliskonstante (  $K_m$  ).

Die  $K_m$  wurde nach der Methode von LINEWEAVER und BURK (1934) bestimmt (siehe Abb.2). Da sich bei der Lineweaver-Burk Auftragung einwandfrei Geraden ergaben, liegt keine Form der Kooperativität vor, sodaß auf eine Ermittlung des Hill-Koeffizienten verzichtet werden konnte (MORIKAWA 1974; BURNS 1968).

Für das Orconectes-Enzym konnten demnach eine

Tab.4:Vergleich d. Michaeliskonstanten u. Aktivatoren versch. L-Serin(bzw.L-Threonin)Dehydratasen

| Herkunft              | K <sub>m</sub> gegenüber L-Serin |        | aktiviert durch: Nucleotid | PP | andere                                        | Autoren                |
|-----------------------|----------------------------------|--------|----------------------------|----|-----------------------------------------------|------------------------|
|                       | 52 mM                            | 87 mM  |                            |    |                                               |                        |
| Rattenleber           | 52 mM                            | 87 mM  |                            |    |                                               |                        |
| " : diätinduziert     | 95                               | 121    |                            |    |                                               | HOSHINO, J. (1969)a    |
| " "                   | 275                              |        |                            |    | K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | "                      |
| " "                   | 57                               | 87     |                            |    |                                               | HOSHINO, J. (1971u.72) |
| " "                   | 52                               | 59     |                            |    |                                               | SUDA (1971)            |
| " "                   | 70                               | 25     |                            |    |                                               | NAGABHUSHANAM (1964)   |
| " "                   |                                  |        |                            |    |                                               | GHAZARIAN (1973)       |
| " "                   |                                  |        |                            |    |                                               | NAKAGAWA (1967)        |
| " "                   |                                  |        |                            |    |                                               | JOST (1969)            |
| " "                   |                                  |        |                            |    |                                               | GOSWAMI (1972)         |
| Schafleber            |                                  |        | cycl. AMP                  |    |                                               |                        |
| " "                   |                                  |        | cycl. AMP                  |    |                                               | SAIYU (1956)           |
| " "                   |                                  |        | AMP(L-Serin)               |    | Glutathion                                    | DAVIS (1962)           |
| " "                   |                                  |        |                            |    | 2 mM KCl                                      | "                      |
| " "                   |                                  |        |                            |    | ohne "                                        | NISHIMURA (1961)       |
| " "                   |                                  |        |                            |    | K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |                        |
| Orconectes limosus    | 19                               | 63     | ADP(L-Threo)               |    |                                               | diese Arbeit           |
| Regenwurm             | 9*                               |        |                            |    |                                               | FUJIMOTO (1965)        |
| Bacterium alvei       | 0,3                              |        |                            |    | K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | GRIFFITHS (1970)       |
| Bacterhefe            | 67                               | 7      |                            |    | Fe <sup>2+</sup>                              | KATSUNUMA (1971)       |
| Clostridium acidurici | 78                               |        |                            |    |                                               | SAGERS (1971)          |
| Clostridium           | 0,5-1,5M                         | 1-10mM | ADP**                      |    |                                               | WHITELEY (1966)        |
| tetanomorphum         | 5-20 mM                          | 1-4 mM | ADP                        |    |                                               | VANQUICKENBORGE (1968) |
| " "                   |                                  | 3,5    | ohne ADP                   |    |                                               |                        |
| " "                   |                                  | 54     | ADP                        |    |                                               | NAKAZAWA (1967)        |
| " "                   |                                  | 3,6    | ohne ADP                   |    |                                               | MORIKAWA (1974)        |
| " "                   |                                  | 37     |                            |    | Mg <sup>++</sup>                              | SHIZUTA (1969)         |
| Corynebacterium sp.   | 5                                | 11     | AMP                        |    |                                               | COHN (1974)            |
| Escherichia coli      | 41                               | 90     | ohne AMP                   |    |                                               |                        |
| Pseudomonas putida    |                                  |        |                            |    |                                               |                        |

\*: Aktivität einer D-Soll gegenüber L-Serin

\*\* : in hochgereinigten Fraktionen Ersatz von ADP durch GDP oder IDP möglich

$K_m$  von  $1,9 \times 10^{-2} M$  für L-Serin und eine  $K_m$  von  $6,3 \times 10^{-2} M$  für L-Threonin als Substrat ermittelt werden.

Wie ein Vergleich der  $K_m$  verschiedener Quellen ergibt (siehe Tab. 4), ist die Affinität des Krebsenzym zum Substrat höher als bei mancher anderen Spezies. Eine phylogenetische Beziehung läßt sich aus den in Tab. 4 aufgeführten  $K_m$  jedoch nicht ableiten, erwähnenswert ist aber, daß in fast allen Fällen, in denen eine Affinität des jeweiligen Enzyms gegen beide Substrate ermittelt wurde, die Affinität zu L-Serin höher ist als zu L-Threonin. Entgegengesetzt verhalten sich Bäckerhefe-(KATSUNUMA 1971), sowie Clostridium Tetanomorphum -Enzym (WHITELEY 1966).

## 2.8.2. Inhibition:

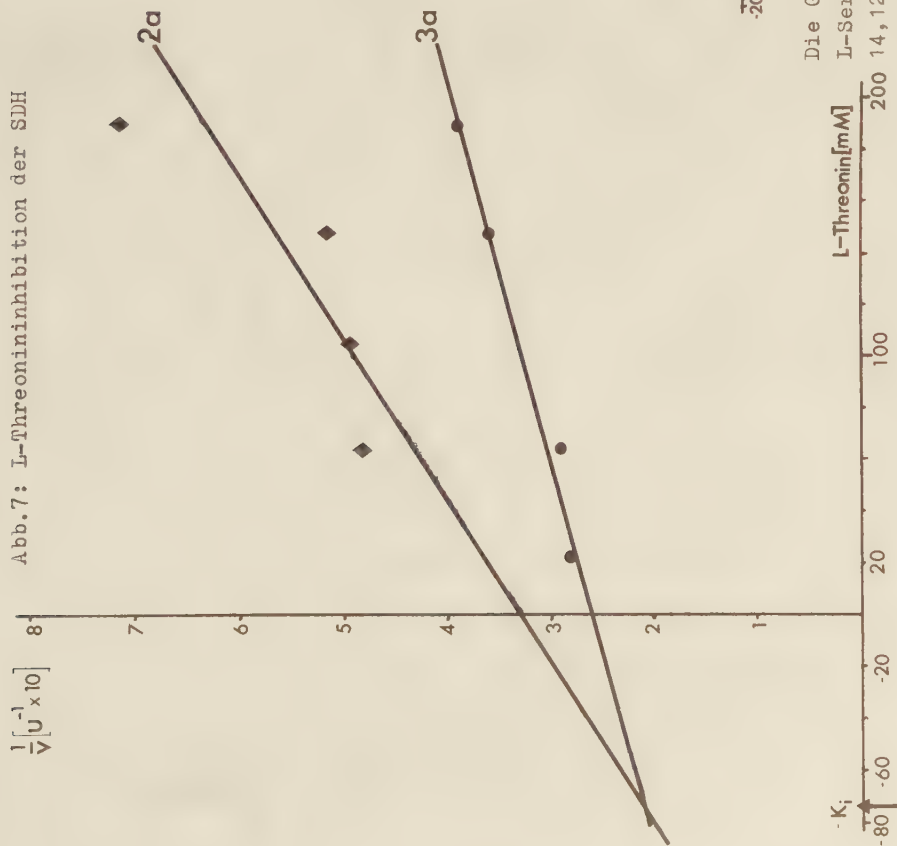
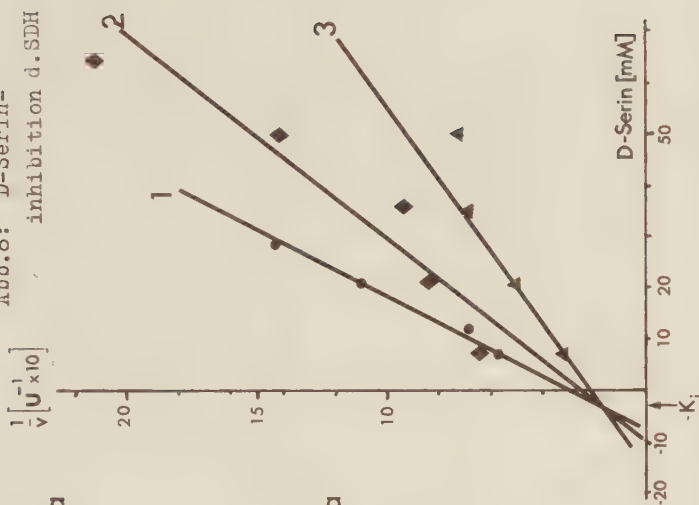
### 2.8.2.1. Inhibitionskonstanten:

Zur Ermittlung von Inhibitionskonstanten wurde die Darstellung nach DIXON (1964) verwendet, da das Diagramm  $\frac{1}{v}$  über (I) (I = Inhibitorkonzentration) dazu besonders geeignet erschien (Abb. 7 und 8).

Bei Ermittlung der Inhibitionskonstanten aus den Mischinkubationen wurde die Methode von HUNTER und DOWNS (zitiert bei DIXON 1964) angewendet. Aus dem Diagramm  $1 - \frac{v_i}{v}$  ( $v_i$  = Geschwindigkeit der Enzymreaktion bei Anwesenheit des Inhibitors,  $v$  = Geschwindigkeit bei Abwesenheit des Inhibitors, jedoch bei der gleichen Substratkonzentration) über der Substratkonzentration  $S$  lassen sich aus der Steigung der Geraden Hemmtyp und an deren Schnittpunkt mit der Ordinate die jeweilige Inhibitionskonstante  $K_i$  ablesen (Abb. 9, 10).

Beim kompetitiven Hemmtyp kann man in das Diagramm nach DIXON (1964) den Ordinatenwert  $\frac{1}{V}$  ( $V$  = maximale Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms) eintragen. Der Schnittpunkt der Geraden, die man bei variablen Inhibitorkonzentrationen und bei einer konstanten Substratkonzentration erhält, mit einer dem Ordinatenwert  $\frac{1}{V}$  entsprechenden Geraden kann zur Ermittlung von  $K_i$  herangezogen werden (siehe Abb. 11).

Abb.7: L-Threonininhibition der SDH

Abb.8: D-Serin-  
inhibition d. SDH

Die Geraden 1, 2, 3 bzw. 2a, 3a entsprechen L-Serin Endkonzentrationen von 0, 353 / 14, 12/35, 3 bzw. 28, 24/70, 6 [mM]

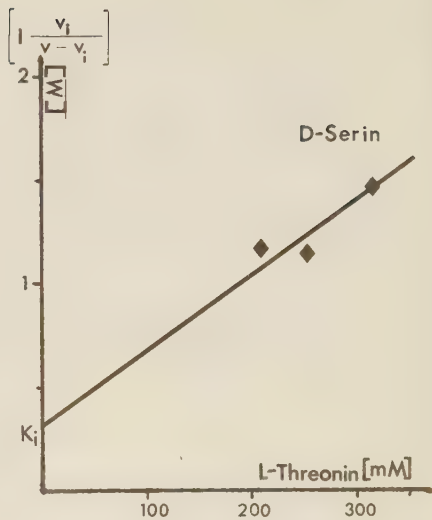
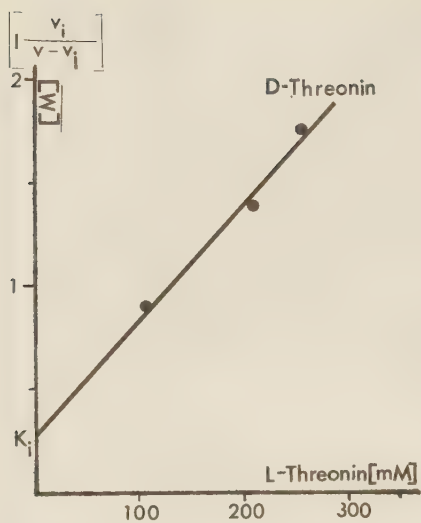
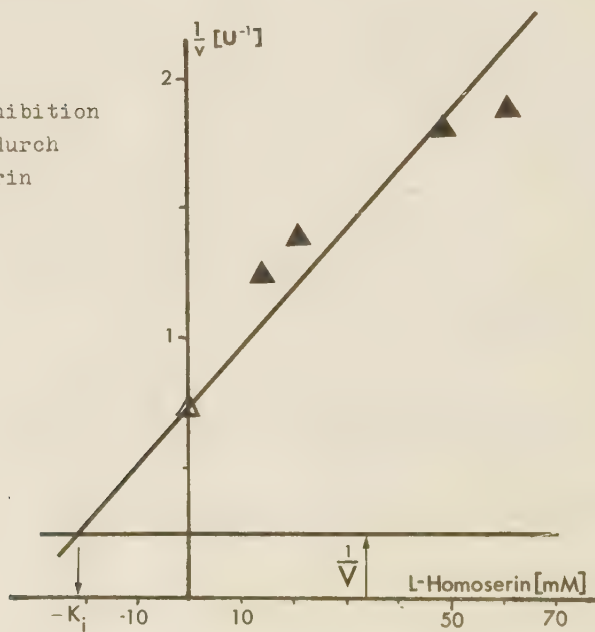


Abb. 9 u. 10: Inhibition der TDH durch D-Threonin, bzw. D-Serin

Abb. 11: Inhibition  
der SDH durch  
L-Homoserin



Auf die vorhin beschriebene Art wurden im DIXON-plot (Abb. 7 und 8) für die L-Serin-dehydratase bei konstanten L-Serinkonzentrationen (im Bereich von 0,353 bis 70,600 mM bei Abb.8) und variablen L-Threonin-, bzw. D-Serin-Inhibitorkonzentrationen Inhibitionskonstanten von 74 mM für L-Threonin und 3 mM für D-Serin ermittelt. Die Inhibition war kompetitiv.

Im modifizierten DIXON-plot wurde bei einer konstanten L-Serinkonzentration von 14,12 mM und variablen L-Homoserinkonzentrationen (als Inhibitor) für die L-Serin Dehydratase eine Inhibitorkonstante (kompetitiver Hemmtyp) von 21 mM für L-Homoserin ermittelt, (siehe Abb.11).

Aus den Mischinkubationen der L-Threonin Dehydratase (bei variablen L-Threoninkonzentrationen als Substrat) mit D-Threonin (Abb.9), bzw. D-Serin (Abb. 10) wurden nach der Methode von HUNTER und DOWNS Inhibitionskonstanten von 260 mM für D-Threonin und 350 mM für D-Serin (kompetitiver Hemmtyp) ermittelt.

In der Literatur werden meist nur Inhibitionen bei Mischinkubationen erwähnt. NAKAGAWA (1969) fand bei der rattenleber-L-Serin-dehydratase eine Inhibitionskonstante von 110 mM für L-Threonin, (kompetitiver Hemmtyp).

#### 2.8.2.2. Mischinkubationen:

Die Inhibition der TDH und SDH durch verschiedene Aminosäuren, meist vom D-Typ, sind in Tabelle 5 dargestellt.

Besonders stark ist die Wirkung von D-Serin als Inhibitor, und zwar in Bezug auf die Enzymaktivität gegenüber beiden Substraten.

Sehr stark ist auch die Hemmwirkung von L-Homoserin bei der SDH.

Interessant ist, daß auch bei Mischinkubationen, bei denen L-Serin oder L-Threonin je für sich allein in Konzentrationen zugegeben, die in etwa die gleiche Aktivität ergaben, bei gemeinsamer Zugabe, trotz sehr geringer L-Serinkonzentration, eine Hemmwirkung zu verzeichnen war.

Tab.5: Mischinkubationen \*

| Aminosäure<br>(Endkonzentration, mM) | Aktivität<br>( U ) | Inhibition<br>( % ) |
|--------------------------------------|--------------------|---------------------|
| L-Serin 49,42                        | 3,258              |                     |
| + D-Serin 21,18                      | 1,322              | 59,4                |
| L-Serin 35,3                         | 2,778              |                     |
| + D-Serin 35,3                       | 0,830              | 70,1                |
| L-Serin 70,6                         | 3,367              |                     |
| + D-Serin 70,6                       | 0,758              | 77,5                |
| L-Serin 14,12                        | 1,396              |                     |
| + L-Homoserin: 14,12                 | 0,770              | 44,8                |
| 21,18                                | 0,698              | 50,01               |
| 49,42                                | 0,553              | 60,4                |
| L-Serin 49,42                        | 3,258              |                     |
| + D-Threonin 62,97                   | 2,971              | 8,8                 |
| L-Serin 70,6                         | 3,367              |                     |
| + D-Threonin 209,91                  | 2,609              | 22,4                |
| L-Serin 1,06                         | 45,45 mU           |                     |
| L-Threonin 126,0                     | 33,77 mU           |                     |
| beide zusammen                       | 43,95 mU           | 3,3                 |
| L-Serin 28,14                        | 2,682              |                     |
| + L-Threonin: 63 u. 105              | beide 2,02         | 24,5                |
| 147                                  | 1,994              | 25,7                |
| 189                                  | 1,225              | 54,4                |
| L-Serin 70,6                         | 3,748              |                     |
| + L-Threonin: 21 u. 63               | beide 3,50         | 7,5                 |
| 147                                  | 2,784              | 26,4                |
| 189                                  | 2,592              | 31,5                |
| L-Threonin 314,86                    | 74,07 mU           |                     |
| + D-Serin 88,23                      | 69,87 mU           | 5,7                 |
| L-Threonin 251,89                    | 66,57 mU           |                     |
| + D-Serin 141,2                      | 58,40 mU           | 12,3                |
| L-Threonin 209,91                    | 63,97 mU           |                     |
| + D-Serin 176,5                      | 55,98 mU           | 12,5                |
| L-Threonin 251,89                    | 66,57 mU           |                     |
| + D-Threonin 167,93                  | 60,97 mU           | 8,4                 |
| L-Threonin 209,91                    | 63,97 mU           |                     |
| + D-Threonin 209,91                  | 55,56 mU           | 13,1                |
| L-Threonin 104,95                    | 37,04 mU           |                     |
| + D-Threonin 314,86                  | 27,78 mU           | 25,0                |

\* : Nicht alle Messreihen konnten direkt nacheinander durchgeführt werden.

Dies stent im Gegensatz zu den Ergebnissen von HOSHINO (1969a) bei der Rattenleber, wobei 200 mM L-Serin die gleiche Aktivität hatten wie eine Mischinkubation von 100 mM L-Serin und 100 mM L-Threonin zusammen, lediglich bei geringen Konzentrationen, wie 50 mM zu 50 mM ergibt sich eine Hemmung von 1,2%. Sonst sind die Hemmwirkungen von D-Serin und D-Threonin bei der SDH ähnlich denen beim Krebsenzym, während bei der TDH-Aktivität beim Krebsenzym die Hemmwirkungen von D-Serin u. D-Threonin deutlich schwächer ausfallen. Im Einklang mit meinen Ergebnissen bei der Mischinkubation L-Serin/L-Threonin stehen jedoch die Ergebnisse von NAKAGAWA (1969) beim Rattenleberenzym, der eine starke kompetitive Hemmung der SDH durch L-Threonin fand.

Analog dem Krebsenzym berichtet WHITELEY (1966) bei *Clostridium tetanomorphum* von kompetitiver Hemmung einer TDH durch D-Serin, D-Threonin, DL-Homoserin und, in diesem Fall entsprechend umgekehrt, durch L-Serin (50 % Hemmung durch Inhibitorkonzentrationen bis 100 mM).

BENTLEY (1974) berichtet entsprechend von einer Hemmung durch L-Serin bei einer TDH bei *Peptococcus prevotii*, bei einer Substratkonzentration von 20mM hemmen D-Threonin und D-Serin (jeweils 100 mM) gleich stark (27 %), während 100 mM DL-Homoserin eine Hemmung von 92 % zur Folge haben.

Eine SDH bei *Corynebacterium* sp. (MORIKAWA 1974), die ausschließlich Aktivität gegenüber L-Serin zeigte, hatte bei Substrat-, bzw. Inhibitorkonzentrationen von jeweils 40 mM eine Hemmung von 43,4 % (D-Serin), jedoch nur von 1,2 % bei L-Threoninzugabe.

Das Enzym verhält sich also, wie schon bei vorher erwähnten Kriterien aufgezeigt, je nach Spezies äußerst unterschiedlich. Jedoch berichten alle Autoren, gleich ob es sich um nur L-Serin oder L-Threonin umsetzende Enzyme handelt, oder die übliche SDH/TDH, von einer starken Hemmbarkeit durch D-Serin, was auf eine hohe Stereospezifität hindeutet.

## II. L-Serin Dehydratase (physiologische Eigenschaften).

### 1. Ergänzungen zur Methodik.

Die Enzymtests des Rohhomogenats bzw. Rohextrakts (siehe I., 2.1.) wurden übernommen, eine Standardisierung durch Verwendung stets 10 %-iger Homogenate und Zugabe konstanter Mengen Enzymlösung erreicht (PETTE 1968).

In der Regel wurde die Aktivität gegen L-Serin gemessen, wo der Aufwand es zuließ, auch die gegen L-Threonin, obwohl grundsätzlich Parallelität zwischen den beiden Aktivitäten bei Reaktionen auf physiologische Ereignisse zu vermuten ist.

### 1.1. Statistik:

Soweit nicht anders angegeben wurden zu jeder Meßreihe mindestens drei Krebse verwendet, zu den daraus resultierenden Mittelwerten wird die mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert als Standardabweichung ( $\pm$ ) angegeben.

Zum statistischen Vergleich zweier Meßreihen wurde der t-Test angewendet, die dazugehörigen p-Werte entstammen den graphischen Tafeln von PATAU (zitiert bei BELITZ 1960). Signifikanzgrenze:  $p = 0,05$ .

## 2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 2.1. Lokalisation des Enzyms in der Zelle

Der 20 000 g Niederschlag ("Mitochondrien" nach GRASZYNSKI) enthielt keine Enzymaktivität, als Homogenisationsmedium wurde nach BEYER (1969), abweichend von GRASZYNSKI (1969) 150 mM KCl in 0,04 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 verwendet.

Der 20 000 g Überstand wurde in einer Beckmann Spinco L 50 Ultrazentrifuge bei 122 000 g zentrifugiert, wobei die gesamte Enzymaktivität im Überstand verblieb.

Es ist also nach althergebrachter Lehrmeinung zu vermuten, daß das Enzym nicht-partikelgebunden, d. h. löslich in der Zelle vorkommt.

### 2.2. Aktivität der L-Serindehydratase: Organverteilung und jahreszyklische Veränderungen in den Organen.

Das Enzym ist stark von jahreszyklischen Schwankungen abhängig (siehe Abb. 12), sodaß konstante Aktivitätsmuster der untersuchten Organe zueinander nicht durchgehend festgestellt werden können. Es wurden die fünf Organe mit der höchsten SDH-Aktivität in Abhängigkeit von Jahreszeit und Geschlecht gemessen, die aufgrund ihrer durchschnittlichen spezifischen Aktivitäten folgende Rangfolge haben: Antennendrüse (300 mU), Kiemen (100 mU), Herz (50 mU), Mitteldarmdrüse (35 mU), Hoden/Ovar (30/20 mU). Ferner sind noch in Enddarm, Muskel und Hypodermis geringe Enzymaktivitäten meßbar (5 - 10 mU). Aktivität des Enzyms gegenüber L-Threonin konnte in den vorgenannten fünf Organen mit der höchsten SDH-Aktivität nachgewiesen werden, aufgrund der geringen spezifischen Aktivität aber nur die Antennendrüse für Vergleichsmessungen verwendet werden, die mit 2-3 mU im Rohextrakt noch die höchste Aktivität aufwies. Aktivität gegenüber D-Serin (bzw. D-Threonin) konnte in keinem Organ nachgewiesen werden (bei der Antennendrüse konnte in Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 mit D-Serin aus einer alten Charge Aktivität nachgewiesen werden, was mit frischen Chargen von verschiedenen Firmen nicht möglich

Erläuterungen zu Abbildung 12: Jahreszeitliche  
Veränderungen der SDH-Aktivität einzelner Organe.

—●— : männliche Tiere

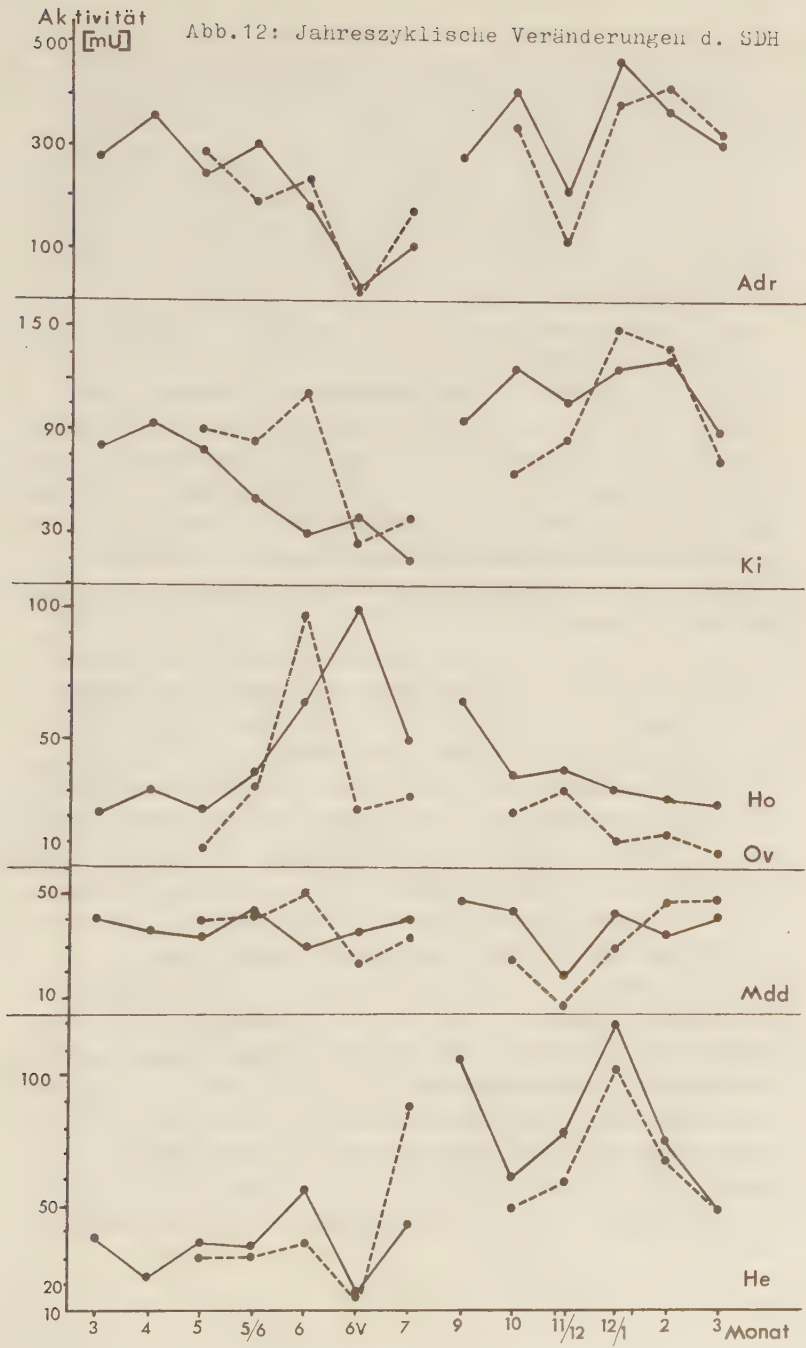
—●—●—●— : weibliche Tiere

Adr= Antennendrüse, Ki= Kiemen, Ho= Hoden, Ov= Ovar,  
Mdd= Mitteldarmdrüse, He= Herz.

Die Monate wurden durchnummeriert: 1 = Januar, bis 12 = Dezember. Bei Bezeichnungen wie 5/6 wurde am Ende (Mai) des einen Monats, bzw. am Anfang des nächsten Monats (Juni) gemessen. Bei 6 V wurde Stunden direkt vor der Häutung gemessen, bei 7 (Juli) wurden Tiere nach der Häutung mit festem hellen Integument verwendet. Dann wurde bis Mitte September (Häutungen wurden gesondert gemessen) mit den Messungen ausgesetzt. Wegen der besseren Übersicht wurde die Einteilung der Monatsskala zwischen den Monaten 5 bis 7 auf die doppelte Länge gestreckt.

Aktivität  
[mU]

Abb.12: Jahreszyklische Veränderungen d. SDH



war). L-Homoserin und L-Cystathionin wurden nur an der Antennendrüse ( im Rohextrakt positiv, siehe Teil I und II dieser Arbeit) getestet.

URICH (1964) wies schon darauf hin, daß die räumliche Ordnung der Stoffwechselprozesse - auch beim Krebs - nicht stabil sein dürfte, sondern regulatorischen Veränderungen unterliegt. Daraus ist zu schließen, daß starre Enzymaktivitätsmuster bei *Orconectes* nur bedingt und unter Berücksichtigung gleicher Entwicklungsstadien aufgestellt werden können. Verschiedene Autoren haben bei der Rattenleber einen Zusammenhang zwischen Glucosestoffwechsel und der SDH festgestellt (JOST 1968, 1969; PERAINO 1964, SANDOVAL 1974), was für *Orconectes* in dieser Arbeit bestätigt wird. Je nach Bedeutung der Organe im Stoffwechsel kann deshalb eine Verschiebung des " Organ-Aktivitätsmusters" der SDH eintreten, wobei eine Kopplung an vielfältige Stoffwechselmechanismen angenommen werden kann.

In Abb. 12 sind die geschlechtsspezifischen Unterschiede der SDH-Aktivität in den Gonaden durch Kopulation der Krebse im zeitigen Frühjahr, Eiablage März/April und unterschiedliche Speichervorgänge von Reservesubstanzen erklärbar, worauf auch Unterschiede des Aktivitätsmusters der SDH von Gonaden zu anderen Organen und beim gleichen Organ von Männchen zu Weibchen zurückzuführen sind. Schon COLLATZ 1968 und SPECK 1967 wiesen geschlechtsspezifische Verschiebungen von Lipid- und Kohlenhydratkonzentrationsmaxima in den Organen des Krebses nach.

Im Allgemeinen reagieren männliche und weibliche Krebse auf einschneidende stoffwechselregulatorische Veränderungen ziemlich gleichsinnig, dem Häutungsminimum der SDH-Aktivität gehen bei beiden Geschlechtern Aktivitätsmaxima voraus, genauso verhält es sich beim Aktivitätsmaximum im Winter, dem ein Minimum im Frühwinter vorangeht.

Betrachtet man nun die einzelnen Organe des Krebses

hinsichtlich ihres SDH-Aktivitätsmusters, so sind die hohe SDH-Aktivität der Antennendrüse und die starken Aktivitätsschwankungen, als Antwort auf physiologische Ereignisse, herzuleiten aus der Stellung der Antennendrüse unter den Organen des Krebses. Sie ist das stoffwechselaktivste Organ, im Aminosäurestoffwechsel (URICH 1967b) wie auch im energieliefernden Stoffwechsel (KELLER 1964), hat die höchste endogene Sauerstoffaufnahme im Homogenat, wobei sie hinsichtlich der Veratmung der angebotenen Substrate am variabelsten ist (KELLER 1964) und am fähigsten ist, freie Glucose zu phosphorylieren. Aus der resorbierenden Funktion der Antennendrüse und der Lieferung der für aktiven Transport benötigten Energie, sowie der Exkretion läßt sich ein Vergleich mit der Wirbeltierniere schließen. Tatsächlich kommt bei Wirbeltieren, außer in der Leber, die SDH nur noch in der Niere, wenn auch in geringerer Aktivität, (FREEDLAND 1964, GRILLO 1970, 1973) in nennenswertem Umfang vor. Auch die Säugetierniere (KELLER 1964) besitzt hohe Aktivitäten von Enzymen des Zuckerphosphatstoffwechsels.

Die Kiemen besitzen nach der Antennendrüse die höchste Enzymaktivität. URICH (1967b) und KELLER (1964) ermittelten dort für Enzyme des Aminosäure-, Zucker- und Citronensäure-stoffwechsels (bzw. Zyklus) nur niedrige Enzymaktivitäten, wobei KELLER erwähnt, daß zumindest beim Kohlenhydratumsatz Glucose energetisch günstiger als bei den anderen Organen umgesetzt werden kann. GRASZYNSKI (1968) berichtet, daß in der Kieme der Fettsäureabbau gegenüber den anderen Stoffwechselwegen bevorzugt wird und führt dies auf ein günstiges  $O_2$ -Angebot zurück. Vielleicht sind die vorgenannten physiologischen Bedingungen in der Kieme ein Grund, weshalb sie auf physiologische Veränderungen im Jahreszyklus mit weniger drastischen SDH-Aktivitätsschwankungen antwortet als es bei der Antennendrüse der Fall ist.

Der Mitteldarmdrüse werden leberähnliche Funktionen zugesprochen (URICH 1961, 1964), wogegen die niedrigen Enzymaktivitäten sprechen (KELLER 1964, URICH 1968). Auch die SDH ist in der Mitteldarmdrüse nicht mit hoher Aktivität vertreten. Sie antwortet auf jahreszyklische Veränderungen nicht sehr stark, außer dem starken Abfall der SDH-Aktivität nach Beendigung der Speicherungsprozesse im November. URICH (1967b) gibt an, daß die Mitteldarmdrüse wegen ihrer bedeutenden Größe und wegen "funktioneller Beziehungen zu den resorbierenden Oberflächen" auch kleinere spezifische Enzymaktivitäten für den AS-Stoffwechsel des Krebses bedeutend sein können. Wesentlich dürfte die Funktion der Mitteldarmdrüse bei Speichervorgängen sein, sie also mehr ein Organ der stofflichen als der Energietransformation ist (URICH 1967a).

Das Herz nimmt im Citronensäurezyklus eine hervorragende Stellung ein, auch am Glucosestoffwechsel ist es führend beteiligt (KELLER 1964). KELLER\* nimmt an, daß durch verschiedene Umwandlungsprozesse Pyruvat gebildet wird, und in den Citronensäurezyklus des Herzmuskels eingeschleust wird. In Zusammenhang mit den hohen Transaminaseaktivitäten im Herz (URICH 1967a) ist dies wohl ein Grund für die hohe SDH-Aktivität. Auch die hohen SDH-Aktivitätsschwankungen im Jahreszyklus, die in ihrer Intensität der bei der Antennendrüse gefundenen durchaus entsprechen, erklären sich aus der stoffwechselphysiologischen Bedeutung dieses Organs.

Bei einem Vergleich der jahreszyklischen Schwankungen der SDH-Aktivität mit den jahreszyklischen Veränderungen des Stoffbestandes (Aufteilung in Stoffklassen) bei *Orcoconnectes limosus* (SPECK 1972) zeigt es sich, daß einem Minimum an Intermediärprodukten, Zuckern, Aminosäuren im Oktober ein Maximum an SDH-Aktivität in Adr, Ki, Mdd (He: Maximum im September) gegenüberstehen. Einem Maximum dieser 3 Stoffklassen im Nov./Dez. steht ein Minimum von Adr, Ki, Mdd und niedrige Werte bei He gegenüber. Entsprechend

---

\*; sowie URICH (1964)

steht einem Minimum dieser 3 Stoffklassen, sowie dem niedrigsten Proteingehalt des Krebses im Jahreszyklus ein erneutes Aktivitätsmaximum der Krebs-SDH bei allen Organen (außer Gonaden) im Dez./Januar gegenüber. Einem Anstieg dieser 4 Stoffklassen zum März steht ein Abfall der SDH-Aktivität von Adr, Ki und He gegenüber, nur die Mdd zeigt einen Aktivitätsanstieg, hat niedrigere Werte in den folgenden Monaten bis zum Anstieg im Juni, parallel zum Kohlenhydratgehalt, wie bei SPECK (1972, bzw. für Juni:1967) beschrieben. Dies ist wohl ihrer vornehmlichen Aufgabe im Speicherstoffwechsel zuzuschreiben. Dem Minimum der 4 Stoffklassen, sowie der Lipide (COLLATZ 1968) steht ein Anstieg der SDH-Aktivität in Adr, Ki und Ho im April gegenüber (beim He ein Monat später).

Offensichtlich kann man bis dahin von einem Stoffwechselschema ausgehen, bei dem ein Maximum der erwähnten 3 Stoffklassen bedeutet, daß von ihnen oder einem ihnen zuzuordnenden Stoff eine hemmende Wirkung auf die SDH-Aktivität ausgeht, die für Intubation von Glucose bei den Versuchen "Induktion und Repression" beschrieben wird.

Bei Betrachtung der SDH-Aktivität im Jahreszyklus scheint diese Wirkung aber von der Funktion des jeweiligen Organs beeinflußt, Gonaden und Mdd sind z.B. nur bedingt, zu bestimmten Zeitpunkten, von diesem Schema abhängig. Das Herz mit seinem hohen Anteil am Citronensäurezyklus zeigt z. Teil Korrelation der SDH mit der Lactat- bzw. Acetat-Verteilung: Maximum im Dez./Januar und Minimum im April sind gemeinsam. Ein anderer Stoffwechselmechanismus muß zur Zeit vor der Häutung (Juni) angenommen werden: ein Maximum sowohl an Lipiden und Kohlenhydraten (SPECK 1967, COLLATZ 1968) als auch an SDH-Aktivität ist in den Organen des Krebses vorhanden. Allgemein kann man sagen: Speichervorgänge im Herbst und Frühjahr, Mobilisierungsphasen vor und nach der Häutung prägen den Jahreszyklus des Krebses, wobei natürlich Veränderungen der Stoffklas-

sen, die innerhalb der Organe unterschiedlich sein können, Veränderungen betroffener Enzyme der jeweiligen Organe entsprechen.

#### Hungerinduktion der L-Serin Dehydratase

Über eine Induktion des Enzyms durch Hunger bzw. die durch den Hungerstoffwechsel beeinflussenden Faktoren haben zahlreiche Autoren berichtet, so für *Peptococcus prevotii* BENTLEY (1974), wo eine Ernähung der SDH-Aktivität schon nach Stunden festzustellen ist. Bei der Rattenleber sind für den gleichen Effect 2-4 Tage notwendig (FREEDLAND 1964, SCHMIDINGER 1967, HOSHINO 1969a), und konnte durch Perfusionsexperimente an der Rattenleber bestätigt werden (CHAN 1971, SANDOVAL 1974). Bei der Hühnerleber ermittelte GRILLO (1970) diesen Effect nach 72 Stunden Hunger.

Die Abhängigkeit der SDH-Aktivität von der Hungerdauer bei den Organen von *Orconectes limosus* ist in Tab. 6 dargestellt. Die Messungen wurden im Winter vorgenommen, wo bei Normaltieren in dem erforderlichen Zeitraum von 5 Wochen Schwankungen vorkommen (siehe "Jahreszyklus"), weshalb die normal gefütterten Kontrolltiere zu jeder Meßreihe parallel auf die SDH-Aktivität in den Organen überprüft wurden. Nach 14 Tagen Hunger wurden die ersten Messungen vorgenommen, da der Krebs einen niedrigeren Energiestoffwechsel als die vorgenannten Spezies besitzt. Bei den Versuchstieren ist bereits bei 2 Organen (Adr, Ho) höhere Aktivität als bei den Kontrolltieren vorhanden, bei den anderen Organen liegt sie jedoch darunter (♂♂), was nach den Untersuchungen von SPECK (1969) an Krebs-♂♂ durchaus denkbar ist. Er fand nämlich in den ersten 14 Tagen nach Hungerbeginn, daß der Energiebedarf überwiegend aus den Lipiden gedeckt wird, während danach (Messung nach 41 Tagen) der Proteinabbau dazu dient. Offensichtlich gibt es in dieser Hinsicht geschlechtsspezifische Unterschiede, was diese Zeitspanne betrifft (von Speck nicht untersucht), da ♀ Versuchstiere bereits nach 14 Tagen in 4 Organen erhöhte Enzymaktivität

Tab.6: Einfluß der Hungerdauer (Tage) auf die SDH-Aktivität (mU) in den Organen d. Krebses

| ♂♂  | 28Tage n=8   |                  |              |                 | 35Tage n=4   |              |            |            |
|-----|--------------|------------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|------------|------------|
|     | 14Tage n=3   | Kontr. n=3       | 28Tage n=8   | Kontr. n=8      | 35Tage n=4   | Kontr. n=4   | 35Tage n=4 | Kontr. n=5 |
| Adr | 456,5 ± 15,5 | 376,1 ± 100,7    | 433,4 ± 75,4 | * 305,6 ± 134,4 | 246,1 ± 84,3 | 227,7 ± 54,5 |            |            |
| Ki  | 143,8 ± 14,3 | 158,9 ± 34,2     | 108,5 ± 27,2 | (*) 83,6 ± 24,4 | -            | -            |            |            |
| Ho  | 68,8 ± 30,9  | 46,1 ± 22,6      | 34,0 ± 7,3   | 34,8 ± 12,4     | 29,3 ± 4,9   | 27,1 ± 10,9  |            |            |
| Mdd | 35,3 ± 17,4  | 65,2 ± 24,8      | 62,5 ± 15,9  | ** 35,2 ± 14,7  | 34,6 ± 13,1  | 40,8 ± 15,1  |            |            |
| He  | 37,2 ± 6,0   | (*) 53,4 ± 9,1   | 73,8 ± 29,4  | 94,1 ± 39,3     | 49,8 ± 10,9  | 47,2 ± 27,6  |            |            |
| ♂♂  |              |                  |              |                 |              |              |            |            |
|     |              |                  |              | TDH (mU):       |              |              |            |            |
| Adr | 459,0 ± 20,6 | (*) 370,4 ± 43,0 |              |                 | 2,0 ± 0,9    | 1,5 ± 0,4    |            |            |
| Ki  | 162,4 ± 31,8 | 138,5 ± 23,0     |              |                 | 2,0 ± 0,3    | 1,8 ± 0,5    |            |            |
| Ov  | 52,9 ± 1,3   | (*) 43,5 ± 6,9   |              |                 |              |              |            |            |
| Ndd | 42,7 ± 12,2  | 47,7 ± 18,2      |              |                 |              |              |            |            |
| He  | 54,4 ± 20,7  | 47,7 ± 18,2      |              |                 |              |              |            |            |

Statistische Signifikanz (t-Test): (\*) p= 0,05

\* p &lt; 0,05

\*\* p &lt; 0,0027

aufweisen. Zumindest ist bei ♂ Versuchstieren beim Herz eine signifikant geringere Aktivität als bei den Kontrolltieren vorhanden. Dieser Effekt gilt nicht für ♀ Krebse. Nach 28 Tagen sind bei den Krebs♂♂ signifikant bei Adr, Ki und Mdd höhere SDH-Aktivitäten bei Hungertieren festzustellen.

Betrachtet man die einzelnen Organe hinsichtlich der Hungerinduktion, so fällt auf, daß Herz (♂) und Mdd nach 14 Tagen deutlich eine niedrige Aktivität aufweisen. Beim Herz steigt die Aktivität langsam, erst nach 35 Tagen entspricht sie der Aktivität der Kontrolltiere, während bei der Mdd nach 28 Tagen Hunger eine hochsignifikante Aktivitätssteigerung zu verzeichnen ist, jedoch ist dieser Effekt nach 35 Tagen nicht mehr vorhanden. Diese Beobachtungen dürften wohl auf die unterschiedliche Rolle dieser Organe im Stoffwechsel zurückzuführen sein.

Bei einer parallelen Messung der TDH wurden die bei der SDH nach 35 Tagen gefundenen Aktivitätserhöhungen bestätigt.

Interessant ist, daß die hohe Aktivitätssteigerung der Mdd (nach 28 Tagen Hunger fast verdoppelte Aktivität) den Aktivitätssteigerungen bei Hühnerleber (GRILLO 1970) und bei Rattenleber (FREEDLAND 1964) durchaus ebenbürtig ist, wobei FREEDLAND als Kontrolltiere Ratten mit Glucose-Diät verwendete. Während GRILLO (1970) bei der Hühnerniere durch Hunger keine SDH-Aktivitätserhöhung erzielen konnte, ist beim Krebs bei einem Organ mit Exkretionsfunktion, der Antennendrüse, zu allen 3 Messzeitpunkten dieser Effekt zu beobachten.

#### 2.4. Häutung, Vorhäutungsstadien und Enzymaktivität:

Einige Autoren haben einen Zusammenhang zwischen Entwicklung bzw. Alter bei der Ratte und der Aktivität der SDH feststellen können (GOSWAMI 1972, SNELL 1974).

Ein entscheidendes Ereignis in der Entwicklung der Krebse ist die Häutung. Wie stark die SDH-Aktivität bereits vor der Häutung davon beinflußt sein könnte, sollte eine Untersuchung der Vorhäutungsstadien (in Tab. 7 aufgeführt) ermitteln. Die Messungen dazu erfolgten innerhalb von 14 Tagen Mitte bis Ende Juni. Vielleicht ist dies der Grund,

Tab.7:Einfluß v. Häutung u. Vorhäutung auf d. SDH-Aktivität

| ♂♂, Stadium: D <sub>3</sub> n=5 | D <sub>3</sub> n=6 | D <sub>4</sub> n=7 |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| Adr 211,9 ±34,9                 | 225,8 ±21,4        | 219,1 ±27,1        |
| Ki 35,7 ±13,1                   | 32,7 ± 5,7         | 25,8 ± 7,2         |
| Ho 88,5 ±22,6                   | 138,4 ±45,3        | 123,8 ±38,9        |
| Mdd 41,1 ± 6,4                  | 42,7 ± 7,9         | 44,4 ±14,9         |
| He 59,4 ±39,3                   | 53,7 ±23,2         | 48,8 ±20,2         |

♀♀ , Zeit nach der Häutung =t

| t= 0-2h n=7         | t=12h n=7    | t=48h n=3   |
|---------------------|--------------|-------------|
| Adr 57,2 ±35,7 (**) | 134,1 ±33,2  | 151,3 ±55,3 |
| Ki 18,8 ±13,8       | 28,8 ±17,4   | 30,6 ± 1,5  |
| Ov 30,5 ±13,1       | 44,4 ±14,1   | 35,1 ± 3,4  |
| Mdd 21,9 ±11,1      | 26,8 ±10,6   | 36,0 ±11,7  |
| He 32,1 ±18,0       | 33,2 ±14,1 * | 59,9 ± 5,0  |

♂♂ , Zeit nach der Häutung =t

| t= 0-2h n=6        | t=12h n=7       | t=48h n=3   |
|--------------------|-----------------|-------------|
| Adr 61,2 ±29,1 **  | 203,6 ±36,7 **  | 303,6 ±24,4 |
| Ki 17,7 ± 7,4 *    | 25,7 ± 3,3 (**) | 35,4 ±3,1   |
| Ho 76,3 ±21,8      | 89,3 ±30,7      | 106,2 ±32,2 |
| Mdd 11,2 ± 9, (**) | 35,0 ±13,9      | 41,7 ±12,7  |
| He 23,8 ±12,7      | 30,9 ±12,8      | 36,9 ±15,5  |

Statistische Signifikanz (t-Test): \* p<0,05  
 (\*\*)p<0,01  
 \*\* p<0,0027

Angabe der SDH-Aktivität im (mU)

weshalb (Jahresrhythmik) die Schwankungen innerhalb der verschiedenen D-Stadien vergleichsweise gering sind. Allgemein fällt die hohe Aktivität aller Organe gegenüber der niedrigen Aktivität direkt nach der Häutung auf, was wohl auf die Mobilisierung von Stoffwechsel und Speichervorgängen (SPECK 1967, COLLATZ 1968) zurückzuführen ist. Außer bei der Mdd, die bei allen 3 D-Stadien keine Veränderung zeigte, ist bei den anderen untersuchten Organen zum D<sub>4</sub> Stadium ein SDH-Aktivitätsabfall zu verzeichnen, wobei Adr und Ho ihre höchste Aktivität im D<sub>3</sub> Stadium, Ki und Herz bereits im D<sub>2</sub> Stadium besitzen. Weiterhin ist die Übereinstimmung zwischen Häutungshormontiter und SDH-Aktivität bei den Vorhäutungsstadien erwähnenswert. WILLIG (1973) findet bereits im D<sub>2</sub> Stadium in *Orconectes* einen maximalen Häutungshormongehalt, der zum D<sub>4</sub> Stadium hin abfällt, um nach der Häutung steil abzufallen.

Nach HERZ-HÜBNER (1973) wird dem Krebs wenige Stunden vor der Häutung injizierte <sup>14</sup>C-Glucose zur Erhöhung des Zuckerspiegels in der Hämolymphe benutzt, außerdem wird die Glucose von den meisten Organen sehr viel stärker als sonst gespeichert, die Inkorporation von <sup>14</sup>C-Glucose in Protein nimmt zu. Erst nach der Häutung wird <sup>14</sup>C-markierte Glucose in Chitin eingebaut (SPECK 1972<sup>a</sup>) und zusammen mit N-Acetylglucosamin dringend benötigt. Das Umschalten des Stoffwechsels auf Protein- bzw. AS-Abbau zu vermuten aus der steigenden SDH-Aktivität im zeitlichen Abstand von der Häutung (Tab. 7), ist so durch Anforderung von Zuckerbausteinen für den Chitinaufbau erklärlich. Folgerichtig ermittelte SPECK (1971), daß nach der Häutung der Monosaccharidspiegel gesenkt wird -der Zucker wird ja für die Chitinbildung "weggefangen"-, während der AS-Spiegel erhöht wird. Die Ergebnisse von SPECK (1971), daß der Krebs bis 2 Tage nach der Häutung nichts frißt, seinen Energiebedarf primär jedoch aus dem Abbau der freien AS bestreitet (SPECK 1972<sup>1</sup>), unterstützen die physiologische Notwendigkeit der Erhöhung der SDH-Aktivität.

Zum Häutungszeitpunkt selbst ist die Hemmung der SDH-Aktivität -respektive AS-Abbaus- besonders stark. Eine Erklärung ist das kurze Nachwirken der von SPECK (1971) direkt vor der Häutung als maximal beschriebenen Speichervorgängen - evtl. im Zusammenhang mit anderen Stoffwechselvorgängen-, so nimmt z.B. der Proteingehalt vor der Häutung zu, danach ab, bereits nach 6 h und (weniger) noch nach 48 h nach der Häutung ist der Gehalt an freien AS stark erhöht - im Einklang mit der SDH-Aktivität nach 12 bzw. nach 48 h, wie Tabelle 7 ausweist.

Die in ganztägiger Dunkelheit gehälterten Tiere zeigten nach der Häutung keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, außer daß bei den ♂♂ meist etwas intensivere Aktivitätssteigerungen zu verzeichnen waren.

## 2.5. Wirkung der Augenstielamputation:

ADELUNG bzw. BÜCKMANN (1964) konnte durch Augenstielamputation bei *Carcinides maenas* verkürzte Häutungsintervalle erzielen. Bei *Orconectes* steht die SDH-Aktivität offensichtlich mit dem an der Häutung beteiligten Stoffwechselmechanismus in Zusammenhang (Tab.7). Da außerdem im Augenstiel bei *Orconectes* das hyperglykämische Hormon gebildet wird (KELLER 1969) und die SDH mit dem Glucosestoffwechsel in Verbindung zu bringen ist - siehe Versuche "Induktion und Repression" - wurde ein Versuch über die Wirkung von Augenstielamputation auf die SDH-Aktivität durchgeführt. Ungefütterten Frischtieren (♂♂) wurden die Augenstiele entfernt. Einer Kontrollgruppe wurde Saline nach Van HARREVELD (1936), der Versuchsgruppe jeweils ein Augenstieläquivalent in der Saline gelöst injiziert. Nach 2 Tagen wurde die SDH-Aktivität gemessen, siehe Tab.8. Dieser Versuch wurde im März durchgeführt, wo die SDH im Jahreszyklus geringe Aktivität besitzt und nach SCHWOCH (1972) die Wirkung des hyperglykämischen Hormons auf den Glucosespiegel besonders hoch ist. Das hyperglykämische Hormon hat nach HAMANN (1973) Steuerungsfunktion, er stellte nach Sinusdrüsenentfernung aus dem Augenstiel ein Ausbleiben der Hämolymphezuckerachwankung fest.

Tab.8: Augenstielamputation und SDH-Aktivität  
in der Antennendrüse

| Injektion von:              | SDH (mU)                | TDH (mU)      |
|-----------------------------|-------------------------|---------------|
| v HARREVELD-Saline<br>n=6   | 301,8 $\pm$ 39,5<br>(*) | 3,7 $\pm$ 0,8 |
| Augenstieläquivalent<br>n=7 | 342,8 $\pm$ 59,0        | 3,7 $\pm$ 0,7 |

Bei den Tieren, denen ein Augenstieläquivalent injiziert worden war, wurde erhöhte SDH-Aktivität gegenüber den augenstielamputierten Tieren festgestellt, die TDH-Aktivität blieb unverändert (Tab. 8). Da nach HAMANN (1973) der Glucosespiegel nach Sinusdrüsenentfernung konstant bleibt, dürften am Zuckerstoffwechsel beteiligte Mechanismen auch weitgehend konstant bleiben. Bei den augenstielinjizierten Tieren, denen normale Stoffwechsel- und Glucoseschwankungen unterstellt werden können, ist die SDH-Aktivität höher (=normal) als bei augenstielamputierten Tieren, deren Stoffwechsel offensichtlich vom Fehlen des Steuerungshormons (HAMANN) beeinflusst wird. Da nach WILLIG (1973) der Hautungshormongehalt beim Krebs im C-Stadium gering ist, ist die Wirkung der Augenstielentfernung (Tab.8) wohl mehr dem Hyperglykämiehormon, bzw. dessen Fehlen im Stoffwechsel und den daraus resultierenden Veränderungen zuzuschreiben.

#### 2.6. Induktion und Repression: Abhängigkeit der SDH-Aktivität von Substrat- und Glucoseintubation.

Zahlreiche Autoren haben einen Zusammenhang zwischen SDH-Aktivität und AS- bzw. Glucosegabe festgestellt. Bei frischgeborenen Ratten konnte ein Anstieg der SDH-Aktivität in der Leber durch Injektion von Glucose oder Insulin unterdrückt werden (SNELL 1974). Erhöhte SDH-Aktivität während der Gluconeogenese fanden ISHIKAWA (1965), sowie auch bei Perfusionsexperimenten CHAN (1971) und SANDOVAL (1974). Auftretende Veränderungen durch Insulin (FREEDLAND 1966, YAMASHITA 1969) oder Glucagon (MOHRENWEISER 1974, ISHIKAWA 1970) werden durch Untersuchungen über

SDH-Induktion-Repression bzw. deren Beeinflussung von STRAUB (1970), JOST (1969), PERAINO (1964) und GOLDSTEIN (1962) bestätigt bzw. ergänzt. MISZCZAK (1974) führt das Ausbleiben einer SDH-Induktion durch Hunger bei vibrationsgestressten Ratten auf die Wirkung des Glucose-Repressionsmechanismus auf die SDH-Aktivität zurück, folgerichtig konnte die SDH-Repression aufgrund einer Glucosediät durch Vibrationsstress gesteigert werden. SUDA (1967) und JOST (1968) konnten durch Glucose-injektion bzw. -diät die SDH-Aktivität erniedrigen und durch AS-injektion bzw. -diät erhöhen, wobei Serin-zugabe den AS-Effekt wesentlich steigerte.

Von einer SDH-Induktion durch AS, zum Teil bei Perfusionsversuchen, berichten SAYRE (1956\*), PERAINO (1965), NAKAGAWA (1969), was von MOHRENWEISER (1972) dagegen nur bei oraler Gabe von AS bestätigt wird. Von einer gegenseitig abhängigen Wirkung AS-level im Organismus/SDH-Aktivität berichten FALLON (1968) und ANDERSON (1968, 1969).

Alle diese Versuche waren an der Kattenleber durchgeführt worden, für Orconectes wurden sie am Organ mit der höchsten SDH-Aktivität, der Antennendrüse, durchgeführt und zur Kontrolle, ob der ganze Organismus betroffen ist, an einem weiteren Organ, wobei organspezifische Einschränkungen zu machen sind. Der Einfluß der AS- bzw. Glucose oder Harreveld-Saline -Intubation ist in Tab. 9a dargestellt, die Krebse waren 8 Wochen lang 2 mal wöchentlich mit Herzfleisch gefüttert und nach 1 Woche Hunger sowie 2 Stunden nach Intubation getötet worden. Allgemein wurde die Intubation folgendermaßen durchgeführt: Mit Hilfe einer Glassonde wurden 100µl Magensaft entnommen, davon wurden 50µl in der Sonde belassen, das Restvolumen wurde durch Harreveld-Saline, in der jeweils 10 mg AS oder Glucose gelöst waren, ergänzt. Dieses Testsubstanz-Magensaft Gemisch wurde sodann luftblasenfrei in den Magen (zurück)gegeben, "intubiert".

Der Einfluß von "AS-freier" Diät, sowie des Zeitfaktors ist in Tab. 9b dargestellt, bei vorheriger Fütterung mit Kartoffeln über 4 Wochen, Tötung 24h nach Intubation. Viele Autoren haben wie FREEDLAND (1964) oder GRILLO (1970) bei

Tab. 9: Einfluß der Intubation von L-Serin, L-Threonin oder L-Glucose auf die SDH-Aktivität (mU).

a) ♂♂, Herzfleischdiät, 1 Woche Hunger, Tötung 2 h nach Intubation von:

|        | Harreveld<br>n=5 | Glucose<br>n=5   | L-Serin<br>n=4     | L-Threonin<br>n=5 |
|--------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| Adr    | 476,5 $\pm$ 88,8 | 386,8 $\pm$ 77,8 | * 516,5 $\pm$ 14,6 | 520,8 $\pm$ 157,0 |
| "(TDH) | 7,6 $\pm$ 0,6 ** | 4,1 $\pm$ 0,8    | * 6,8 $\pm$ 1,4    | 8,3 $\pm$ 2,7     |
| Herz   | 93,8 $\pm$ 14,0  | 93,2 $\pm$ 16,1  | 107,3 $\pm$ 20,6   | 106,4 $\pm$ 17,3  |

b) ♂♂, Kartoffeldiät, Tötung 24 h nach Intubation von:

|         | Harreveld<br>n=5 | L-Serin<br>n=5       |
|---------|------------------|----------------------|
| Adr     | 290,9 $\pm$ 50,6 | (*) 355,1 $\pm$ 41,7 |
| " (TDH) | 2,4 $\pm$ 1,0    | (*) 4,2 $\pm$ 1,1    |
| Ki      | 70,3 $\pm$ 7,4   | (*) 115,2 $\pm$ 41,4 |

c) ♂♂, Herzfleischdiät, über 3 Tage eine tägliche Intubation, Tötung 3 Tage nach der 1. Intubation:

|         | L-Serin<br>n=5   | Glucose<br>n=4     | L-Threonin<br>n=4 |
|---------|------------------|--------------------|-------------------|
| Adr     | 327,2 $\pm$ 31,2 | 315,9 $\pm$ 24,7   | 299,6 $\pm$ 22,1  |
| " (TDH) | 2,7 $\pm$ 0,7    | (**) 1,0 $\pm$ 0,4 | (*) 1,8 $\pm$ 0,4 |

Statistische Signifikanz ( t-Test ): (\*) p=0,05

\* p<0,05

(\*\*) p<0,01

\*\* p<0,0027

(TDH)  $\hat{=}$  TDH-Aktivität (mU) der Adr.

Induktionsversuchen als Kontrolltiere Tiere mit Glucose-diät bezeichnet, da ja bereits hohe Proteindiät die SDH erhöht. So wurde bei normalgefütterten Tieren überprüft, ob nach Tagen täglicher AS-oder Glucose-Intubation Unterschiede in der SDH-Aktivität festzustellen sind (Tab. 9c).

Bei HERZ-HÜBNER (1973b) wird festgestellt, daß der Turn-over von AS rascher ist als von Zuckern und organischen Säuren und daß nach Berechnung der Anreicherungsfaktoren für die Hämolympsubstanzen in den Organen Pyruvat (Produkt der SDH-Reaktion) und viele andere HL-Substanzen besonders stark in Adr, Ki und Herz eingelagert werden, entsprechend sind auch die Anreicherungsfaktoren für Serin in den Organen. Es besteht also eine Beziehung zwischen Pyruvat, bzw. Serin-anreicherung und SDH-Aktivität, siehe im Kapitel Jahreszyklus die Organverteilung<sup>+</sup>, sowie Tab.9.

Nach URICH (1973) wird intubierte <sup>14</sup>C-Glucose bereits in den resorbierenden Geweben zu je einem Drittel in organische Säuren und AS umgewandelt. Das Drittel an Zuckern jedoch, das nach Resorption und erfolgter Umwandlung zu den Geweben gelangt, macht offenbar für eine gewisse Zeit die Umwandlung von AS zu Zuckerbausteinen nicht erforderlich, also wird die SDH-Aktivität eingeschränkt. Ein Sättigungseffekt des Glucosestoffwechsels durch Glucosezufuhr wurde durch HERZ-HÜBNER (1973a) nach Hinweisen von SPECK (1970) aufgezeigt.

Bei Bedarf für Glucose-bausteine (Hungerinduktion der SDH) und anderer Energienachfrage werden primär die freien AS abgebaut - die SDH-Aktivität steigt, wobei eine Wechselbeziehung AS-level—SDH-Aktivität angenommen werden kann (siehe Versuch "Osmolarität"), da die freien AS trotz kurzzeitiger, physiologisch bedingter Schwankungen, auf konstanter Höhe gehalten werden (SPECK 1972<sup>1</sup>). Deshalb ist auch nach Tagen gleichmässiger AS-Intubation eine Substratinduktion bei SDH durch Serin, bei TDH durch Threonin und Serin festzustellen (Tab.9c), während Glucose als Energienachschub demgegenüber die Enzymaktivitäten mindern kann.

—<sup>+</sup>: Adr, Ki und He sind d. Organe mit d.höchsten SDH-Akt.

JOST (1970) fand bei erhöhtem AS-level in der Rattenleber -herbeigeführt z.B durch hohe Proteindiät- eine Vermehrung von cyclischem AMP 3'5', welche wiederum eine Induktion der SDH-Aktivität, auch herbeiführbar durch Injektion von cyclischem AMP, bewirken soll. GOSWAMI (1972) meinte ähnliches und stellte die Reaktionsfolge Hunger-Glucagonfreisetzung-Vermehrung von cycl. AMP  $\rightarrow$  Induktion der SDH in der Leber auf. Sonst wird aber kaum von einer Aktivierung der SDH durch Cycl. AMP berichtet (siehe Tab.4). Lediglich SNELL (1974) konnte diesen Effekt noch nachweisen, und zwar nur bei bis zu 4 Tage alten Ratten, womit er als allgemeiner Stoffwechselmechanismus ausscheidet, bei *Orconectes limosus* wurde allerdings der Nucleotidgehalt noch nicht spezifiziert. Gegen diesen Mechanismus beim Krebs spricht auch, daß er seinen primären Energiebedarf aus den freien AS deckt, wobei die SDH eine Rolle spielen kann (Hunger-induktion), während die Wirbeltiere dazu Zucker verwenden.

## 2.7. Osmoregulation und Enzymaktivität:

Von einem Einfluß osmotischer Faktoren hat bisher noch niemand berichtet, außer daß eine Aktivierung durch Salzionen möglich ist (Tab.4). Für *Orconectes* wurde diese Art der Aktivierung nicht nachgewiesen, wohl aber eine inaktivierende Wirkung auf die Enzymaktivität aufgrund hoher Salzkonzentrationen (Teil I, Abschnitt "Aktivierung"). Setzt man *Orconectes limosus* von Süß- in Salzwasser (künstliches Meerwasser 650 mosmolar, nach SIEBERS 1972), so ist ein Einfluß der Osmoregulation, nach 11-tägiger Adaptation, auf die SDH-Aktivität erkennbar (Tab.10). Die ♂ Krebse mit einem Frischgewicht von 15-18g, gehältert bei 20-22°C, waren im Zwischenhäutungsstadium (Winterhalbjahr) und wurden bis 3 Tage vor Versuchsbeginn mit Herzfleisch gefüttert. SIEBERS (1972) fand bei Untersuchung der Stoffklassen, daß die Osmoregulation der Salzwassertiere weitgehend durch Erhöhung der Konzentration der freien AS erfolgt. So ist dieser AS-level bei Salzwassertieren nach 1 Tag um 19 %, jedoch

nach 10 Tagen um 77 % gegenüber den Süßwassertieren erhöht.

Tab. 10: Einfluß der Osmolarität auf die SDH-Aktivität nach 11 Tagen Adaptation bei Krebs  $\delta\delta$  in Salz- und Süßwasser nach 14 Tagen Hunger.

|      | Salzwasser<br>n=10 |    | Süßwasser<br>n=6 | Statist. Signifikanz:     |
|------|--------------------|----|------------------|---------------------------|
| Adr  | 350,7 $\pm$ 97,7   | *  | 247,9 $\pm$ 21,4 | * p<0,05                  |
| Ki   | 149,9 $\pm$ 53,0   | ** | 62,5 $\pm$ 4,0   | ** p<0,0027               |
| Ho   | 31,5 $\pm$ 13,6    |    | 22,9 $\pm$ 6,0   |                           |
| Mdd  | 111,3 $\pm$ 27,4   | ** | 58,5 $\pm$ 14,8  | SDH-Aktivität<br>in (mU). |
| Herz | 100,8 $\pm$ 47,3   | *  | 46,1 $\pm$ 12,3  |                           |

Eine Erhöhung der freien AS fand SPECK (1971) auch nach der Häutung, was zurückzuführen ist auf Wasseraufnahme zur Volumenvergrößerung während der Häutung. Dieser AS-level sinkt wesentlich erst nach über 2 Tagen. Diese intrazelluläre isosmotische Regulation erfolgt durch de novo Synthese von AS (SPECK 1971), daraus erklärt sich auch die geringe SDH-Aktivität bis 2h nach der Häutung (siehe "Häutung"). Dann, nach 12h steigt die SDH-Aktivität, AS-Abbau, Proteinabbau und andere Stoffwechselvorgänge werden gesteigert.

Dagegen konnte SIEBERS (1972) bei der Osmoregulation die Erhöhung des AS-levels auf Proteinabbau zurückführen, da die essentiellen AS eher mehr zunehmen als abnehmen. Da er in diesem Zusammenhang eine allgemeine Stoffwechselintensivierung annimmt in Bezug auf Protein, ist ein Zusammenhang AS-level zur SDH-Aktivität, wie auch bei "Häutung" und "AS-Intubation" anzunehmen. Erwähnenswert ist, daß bei den Organen, bei denen eine starke  $O_2$ -Versorgung gewährleistet ist, wie Ki und Herz, die Erhöhung der SDH-Aktivität bei der Osmoregulation besonders stark ist (Tab.10). SIEBERS (1972\*) fand bei seinem nächsten Untersuchungs-

-objekt, der Strandkrabbe *Carcinus maenas*, einen Zusammenhang zwischen  $O_2$ -Verbrauch und Salinität.

#### SCHLUSSEBETRACHTUNG

Die hohe L-Serin(Threonin) Dehydratase-Aktivität bei *Orconectes limosus* -trotz wesentlich geringerer Stoffwechselintensität ist die spezifische Aktivität des Enzyms keineswegs geringer wie bei der Ratte- ist zusammen mit anderen am AS-Stoffwechsel beteiligten Enzymen hoher spezifischer Aktivität (URICH 1967a,b) erklärlich aus der Bedeutung des AS-Stoffwechsels bei physiologischen Ereignissen, und, innerhalb dieses Stoffwechsels, die Bedeutung der SDH.

Die biochemischen Eigenschaften des gereinigten Enzyms aus der Antennendrüse weisen keine gravierenden Unterschiede zu denen anderer Enzymquellen auf, außer einer hohen Empfindlichkeit des Krebsenzym während der Reinigung, wovon auch beim Rattenleberenzym berichtet wird (HOSHINO 1969b). Derselbe Autor berichtet von einem ähnlich hohen MG, was vermuten läßt, daß Molekülstruktur u. ä. die Ursache dieser Empfindlichkeit sind. Sonst kann man eine, phylogenetisch begründbare, Bandbreite der untersuchten Eigenschaften feststellen (siehe Tabellen 2,3,4). Bei den kinetischen Eigenschaften ist darauf hinzuweisen, daß nach SKERE (1967) die eines konzentrierten Enzyms verschieden von denen eines verdünnten Enzyms sein können. Nach der diskoelektrophoretischen Analyse besitzt das Krebsenzym 2 Banden, wovon die eine das doppelte MG der anderen besitzt (diskoelektrophoretische MG-Bestimmung), woraus auf eine Aggregation von 2 Enzymeinheiten geschlossen werden kann. Auch J.P. SIMON (1974), D. SIMON (1973), NAKAGAWA (1969) weisen Zweibandigkeit des Enzyms (aus anderen Quellen) nach, wobei letzterer Berichte von einer Einbandigkeit (JOST 1968: Ratte, KATSUNUMA 1971: Bäckerhefe) auf zu geringe Proteinkonzentrationen während der diskoelektrophoretischen Trennung zurückführt. Beim Krebs wurde Aktivität nur bei der niedermolekularen Bande nachgewiesen.

Nach dem Bericht von NAKAGAWA (1967), daß Antikörper gegen gereinigte SDH im Rohextrakt SDH und TDH, nicht aber L-Cystathionin Synthetase hemmen, mußte letztere als separates Enzym angenommen werden, sie konnte beim Krebs nur im Rohextraktkonzentrat nachgewiesen werden.

Bemerkenswert ist noch die hohe Affinität der SDH zu Ionenaustauschern, erst aktivitätsmindernde hohe Salzkonzentrationen ermöglichten ein Ablösen des Enzyms.

Zur physiologischen Rolle des Enzyms ist zu sagen, daß keine Unterschiede von SDH- zur TDH-Aktivität bei Reaktionen auf physiologische Ereignisse ermittelt wurden. Bei gleicher Tendenz, z.B. Induktion erhöhter Enzymaktivitäten, konnte eine Enzymaktivität stärker ausgeprägt reagieren.

Einerseits steht die SDH in Zusammenhang mit der Regulation der Konzentration der freien AS. Veränderungen des AS-levels, meist kurzfristiger Art, in Zusammenhang mit Hunger, AS-Intubation, Häutung und Osmoregulation werden von Änderungen der SDH-Aktivität begleitet.

Andererseits steht die SDH in Verbindung zur Gluconeogenese, worauf Veränderungen der SDH-Aktivität bei Glucose-Intubation oder bei Ausfall der Hyperglykämie-hormonsteuerung auf den Glucose-level bei Augenstielablation hindeuten. Ähnliches gilt für die jahreszyklischen Schwankungen beim Speicherstoffwechsel.

Da *Orconectes* primär seinen Energiestoffwechsel aus den freien AS bestreitet (SPECK 1972<sup>1</sup>), ist die physiologische Bedeutung der SDH evident.

Im Gegensatz zu manchen D-SDH's (FUJIMOTO 1965, LABOW 1966) reagiert die L-SDH bei *Orconectes* wie alle anderen L-SDH's streng stereospezifisch. Starke kompetitive Inhibition durch D-Serin wird bei allen daraufhin untersuchten L-SDH's festgestellt. Beim D-Aminosäurestoffwechsel bei *Orconectes* spielen D-Aminosäureoxydasen (URICH 1967a u. 1968) eine entscheidende Rolle.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Untersuchung der L-Serindehydratase umfaßt die Reinigung, Charakterisierung des gereinigten Enzyms, sowie die physiologischen Eigenschaften des Enzyms.

1. Das Enzym wurde durch fraktionierte Ammonsulfatfällung und Gel-filtration auf Sephadex G200 gereinigt. Wegen der großen Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Verdünnung, langdauernden Trennungsgängen und höheren Salzkonzentrationen (über 0,1M) erwies sich die Reinigung an Ionenaustauschern als ungeeignet. Aktivitätsverlust bei 4°C: Beim Rohextrakt 30% in 20h, beim gereinigten Enzym über 50% in 8 bis 10h. Das gereinigte Enzym hatte eine spezifische Aktivität von 4,05 U/mg Protein für die SDH und 60 mU/mg Protein für die TDH.
2. Elektrophoretische Untersuchungen des gereinigten Enzyms ergaben 2 Banden. Enzymaktivität war in der Bande niedrigeren Molekulargewichts nachweisbar.
3. Die diskoelektrophoretische MG-Bestimmung ergab für diese Bande ein MG von 290 000. Aus dem MG der zweiten Bande (582 000) läßt sich auf Aggregation von Enzymmolekülen schließen.
4. Die Dissoziationskonstante des Coenzyms PP betrug  $4,7 \times 10^{-5}$  M.
5. Als optimal wurde für beide Enzymaktivitäten des gereinigten Enzyms ein pH von 8,2 in 0,1 M Kaliumboratpuffer ermittelt.
6. Aktivierung durch Salze konnte nicht nachgewiesen werden, Konzentrationen über 0,1M hemmen, nur  $K^+$ -Salze hemmen erst bei etwas höherer Konzentration (0,15-0,2M). Ein allosterischer Effekt tritt nur bei der TDH-Aktivität durch ADP auf.
7. Das Enzym ist stereospezifisch für L-Serin u. L-Threonin.
8. Im Rohextrakt sind Aktivitäten der L-Homoserin Dehydratase und der L-Cystathionin Synthase (ca. 10, bzw. um 1mU) nachweisbar, nicht aber in gereinigten Enzymfraktionen der SDH.
9. Die Michaeliskonstanten (LINWEAVER+BURKE 1954) betragen  $1,9 \times 10^{-2}$  M für L-Serin, sowie  $6,3 \times 10^{-2}$  M für L-Threonin als Substrat. Die Inhibitionskonstanten (nach HUNTER u. DOWNS aus Mischinkubationen, sonst nach DIXON 1964) betragen für die SDH 21mM für Homoserin, 3mM für D-Serin und für die TDH 260mM für D-Threonin, 350mM für D-Serin (allesamt kompetitiver Hemmtyp). Bei Mischinkubationen wurden Hemmung der SDH durch D-Threonin und -auch bei geringer Konzentration- durch L-Threonin festgestellt,  $K_i = 74$  mM (kompetitiv).

10. Das nicht-partikelgebundene Enzym ist von jahreszyklischen Schwankungen abhängig und kommt in durchschnittlicher spezifischer Aktivität vor in Adr (300mU), Ki (100mU), He (50mU), Mdd (35mU), und Ho/Ov (30/20 mU) [SDH-Aktivität]. Aktivität der TDH konnte in diesen Organen auch nachgewiesen werden, jedoch ist ihre Aktivität sehr gering, höchste Aktivität in der Adr mit  $\sim 3$  mU.

11. Das Enzym reagiert mit erhöhter Aktivität bei Beeinflussung des AS-levels durch Hunger oder AS-Intubation.

12. Bei Erhöhung des AS-levels durch Osmoregulation war bei *Orconectes* nach 11 Tagen Aufenthalt in Salzwasser, sowie 48 u. 12 h nach der Häutung ein signifikanter Aktivitätsanstieg zu verzeichnen. Bis zu 2h nach d. Häutung war die SDH-Aktivität sehr stark gesenkt.

13. Bei den Vorhäutungsstadien ist eine Korrelation zwischen Häutungshormongehalt und SDH-Aktivität festzustellen.

14. Die von anderen Autoren (bei der Ratte) berichtete Beziehung des Enzyms zur Gluconeogenese konnte für *Orconectes* durch Aktivitätsminderung aufgrund von Glucose-Intubation bestätigt werden. Außerdem wurde nach Augenstielablation durch den dadurch verursachten Ausfall des den Glucose-level steuernden Hormons ein Aktivitätsabfall erzielt.

## Literaturverzeichnis

- ANDERSON, H.L., N.J. BENEVENGA and A.E. HARPER (1968): Associations among Food and Protein Intake, Serine Dehydrase and Plasma Amino Acids.  
Am.J.Physiol. 214 1008-1013
- , N.J. BENEVENGA and A.E. HARPER (1969): Effect of prior high Protein Intake on Food Intake, Serine Dehydratase Activity and Plasma Amino Acids of Rats fed Amino Acid-imbalanced Diets.  
J.Nutrition 97 463-474
- BELTZ, H.J. (1960): Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie.  
Der Mathematikunterricht 3 83-103
- BENTLEY, C.M. and E.A. DAWES (1974): The Energy-Yielding Reactions of *Peptococcus prevotii*, Their Behavior on Starvation and the Role and Regulation of Threonine Dehydratase.  
Arch.Microbiol. 100 363-387
- BENZIMAN, M., R.S. SAGERS and I.C. GUNSALUS (1960): L-Serine specific Dehydrase from *Clostridium acidu-urici*.  
J.Bacteriol. 79 474-479
- BEYER, J. (1969): Glutamatdehydrogenase aus *Orconectes limosus*. Reinigung und Charakterisierung. Diss. FU Berlin
- BROWN, F.C., J. MALLADY and J.A. ROSZELL (1966): The Separation of Rat Liver Serine Dehydratase and Cystathionine Synthase.
- BONITATI, J., W.B. ELLIOTT and P.G. MILES (1969): Interference by Carbohydrate and other Substances in the Estimation of Protein with the Folin-Ciocalteu Reagent.  
Anal.Biochem. 31 399-405
- BUCKMANN, D. und D. ADELUNG (1964): Der Einfluß der Umweltfaktoren auf das Wachstum und den Hautungsrhythmus der Strandkrabbe *Carcinides maenas*.  
Helgol.Wiss.Meeresunters. 10 91-103
- BURNS, R.O., G.W. ROBINSON and M.H. ZARLENGO (1968): Threonine Deaminase from *Salmonella Typhimurium*, I. Purification and Properties.  
J.Biol.Chem. 243 178-185
- CHAN, T.M., and R.A. FREEDLAND (1971): The Role of L-Serine Dehydratase in the Metabolism of L-Serine in the Perfused Rat Liver.  
Biochim.Biophys.Acta 237 99-106
- CHARGAFF, E. and D.B. SPRINSON (1943): Studies on the Mechanism of Deamination of Serine and Threonine in Biological Systems.  
J.Biol.Chem. 151 273-280

- CHATAGNER, F., A. HIRSCH, O. DURIEU-TRAUTMANN and M-C. RAIN (1969): Activities of Cystathionase, Cysteine Sulphinic Acid Decarboxylase and Serine Dehydratase in the Liver of Tumour-Bearing Rats. *Experientia* 25 1077-1078
- COHN, M.S., and A.T. PHILLIPS (1974): Purification and Characterization of a  $P_8$ -Independent Threonine Dehydratase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 13 1208-1214
- COLLATZ, K.-G. (1966): Das Lipidspektrum des Flußkrebses *Orconectes limosus* und seine jahreszeitlichen Veränderungen. Diss. FU Berlin
- COWGILL, R.W. and A.B. PARDEE (1957): Experiments in Biochemical Research Techniques. Ed. J. Wiley & Sons Inc., Chapman & Hall Ltd., N.Y. and London
- DAVIS, L. and D.E. METZLER (1962): The pH-Dependence of the Kinetic Parameters of Threonine Dehydratase. *J. Biol. Chem.* 237 1883-1889
- DETERMANN, H. (1967): Gelchromatographie. Springer Verlag, Berlin
- DIXON, M. and E.C. WEBB (1964): "Enzymes" Monographie, 2. Aufl. Ed. Longmans, Green and Co. Ltd., London
- DOONAN, S., D.H. KOERNER, W. SCHMUTZLER and C.A. VERNON (1974): Inducibility and some Properties of the Threonine Dehydratase of Sheep Liver. *Biochem. J.* 144 533-541
- DRACH, P. (1959): Mue et Cycle d'intermue chez les Crustacés Decapodes. *Ann. Inst. Oceanogr. Monaco* 19 103-391
- FALLON, H.J., J.L. DAVIS and R.A. GOYER (1968): Effect of Protein Intake on Tissue Amino Acid Levels and the Enzymes of Serine Biosynthesis in the Rat. *J. Nutrition* 96 220-229
- FREEDLAND, R.A. and E.H. AVERY (1964): Studies on Threonine and Serine Dehydratase. *J. Biol. Chem.* 239 3357-3360
- , T.L. CUNLIFFE and J.G. ZINKL (1966): The Effect of Insulin on Enzyme Adaptations to Diets and Hormones. *J. Biol. Chem.* 241 5448-5451
- FUJIMOTO, D. and E. ADAMS (1965): D-Serine Dehydratase of Earthworm Tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 105 596-599
- GHAZARIAN, H.G. and R. BORCHERS (1973): Purification and Properties of Rat Liver L-Threonine Dehydratase. *Int. J. Biochem.* 4 537-541

- GRASZYŃSKI, K., D. SIEBERS, I. TOFAUTE u. I. BRUNNER (1969):  
Malatdehydrogenasen unterschiedlicher Herkunft: Hemmung  
durch Thyroxin.  
Z. Naturforschung 24b 783-784
- GAFFITHS, S.K. and R.D. DEMOSS (1970): Physiological comparison  
of L-Serine Dehydratase and Tryptophanase from  
*Bacillus alvei*.  
J. Bacteriol. 101 813-820
- GRILLO, M.A., T. FOSSA and M. COGHE (1970): Effect of Dietary  
and Hormonal Factors on L-Serine Dehydratase and D-Serine  
Dehydratase Activities of Chicken Liver.  
Enzymologia 39 248-254
- (1973): Serine Dehydratases in Animal Tissues.  
Acta Vitaminol. Enzymol. (Milano) 27 51-61
- GOLDSTEIN, L., W.E. KNOX and E.J. BEHRMAN (1962): Studies on the  
Nature, Inducibility and Assay of the Threonine and Serine  
Dehydrase Activities of Rat Liver.  
J. Biol. Chem. 237 2855-2860
- GOSWAMI, M.N.D., H. BOULEKBACHE and F. MEURY (1972): Age-Correlated  
Variations of Rat Liver Serine Dehydratase and Tyrosine  
Aminotransferase Activities - a Comparative Analysis.  
Comp. Biochem. Physiol. 41B 323-330
- HAMANN, A. (1975): AUGENSTIELKOMPLEX und circadiane Rhythmik der  
Hämolympheglucose beim Flußkrebs sowie Untersuchungen über die  
Hämocytenaggregation bei der Crustaceen-Blutgerinnung.  
Diss. FU Berlin
- HARPER, A.E. (1965): Effect of variations in Protein Intake on  
enzymes of Amino Acid Metabolism.  
Can. J. Biochem. 43 1589-1603
- van HARREVELD, A. (1936): A Physiological Solution for fresh-  
water Crustaceans.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 4 428-432
- HATFIELD, G.W. and H.E. UMBARGER (1970): Threonine Deaminase  
from *Bacillus subtilis*. (Purification of the Enzyme).  
J. Biol. Chem. 245 1736-1741
- HEDRICK, J.L. and A.J. SMITH (1968): Size and Charge Isomer Separation  
and Estimation of Molecular Weights of proteins by  
Disk Gel Electrophoresis.  
Arch. Biochem. Biophys. 126 155-164
- HIRAHATA, M., M. TOROSHIGE, A. INAGAKI and O. HAYAISHI (1964):  
Nucleotide Activation of Threonine Deaminase from  
*Escherichia coli*.  
J. Biol. Chem. 240 1711-1717

- HOSHINO, J., and H. KRÖGER (1969a): Properties of a L-Serine Dehydratase purified from Rat Liver after Induction by Fasting or feeding Casein Hydrolysate.  
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 350 595-602
- , (1969b): Evidence for the Presence of two Forms of L-Serine Dehydratase in Rat Liver.  
FEBS LETTERS 2 298-300
- , D. SIMON and H. KRÖGER (1972): Influence of Monovalent Cations on the Activity of L-Serine (l-Threonine) Dehydratase from Rat Liver. The Control of Threonine-Serine Activity Ratio.  
Eur.J.Biochem. 27 388-394
- HERZ-HÜBNER, U. und K. URICH (1973a): Resorption des alten Panzers vor der Häutung bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus*. II. Unterschiede im Schicksal von N-Acetylglucosamin und Glucose bei Vorhäutungstieren.  
J.Comp.Physiol. 86 159-169
- , -, und U. SPECK (1973): Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus*. IV. Turnover und Organverteilung der Zucker, Aminosäuren und organischen Säuren der Hämolymphe.  
J.Comp.Physiol. 86 171-185
- ISHIKAWA, E. and K. NAKAJIMA (1970): Hormonal and Dietary Control of Enzymes in the Rat. I. Roles of the Pancreas and Adrenals in Regulation of Liver Serine Dehydratase Activity.  
J.Biochem.Tokyo 67 685-692
- , T. NINAGAWA and M. SUDA (1965): Hormonal and Dietary Control of Serine Dehydratase in Rat Liver.  
J.Biochem.Tokyo 57 506-513
- di JESO, F. (1968): Ammonium Sulfate Concentration Conversion Nomograph for 0° C.  
J.Biol.Chem. 243 2022-2023
- JOST, J.-P., E.A. KHAIRALLAH and H.C. PITOT (1968): Studies on the Induction and Repression of Enzymes in Rat Liver. V. Regulation of the Rate of Synthesis and Degradation of Serine Dehydratase by Dietary Amino Acids and Glucose.  
J.Biol.Chem. 243 3057-3066
- , A.W. HSIE and H.V. RICKENBERG (1969): Regulation of the Synthesis of Rat Liver Serine Dehydratase by Adenosine 3'5'-Cyclic Monophosphate.  
Biochem.Biophys.Res.Comms. 34 749-754
- , -, D. HUGUES and L. RYAN (1970): Role of Cyclic Adenosine-3'5'-monophosphate in the Induction of hepatic Enzymes.  
J.Biol.Chem. 245 351-357

- KAGAN, Z.S., E.M. SINELNIKOVA and W.L. KRETOVICH (1969a): Biosynthetic L-Threonine Dehydratase in Mushroom.  
Biochimija 34 1279-1288
- , -, - (1969b): Certain kinetic and allosteric Properties of L-Threonine Dehydratase in *Melampyrum nemorosum* L.  
Dokl.Acad.Nauk SSSR 185 1372-1375
- KAPKE, G. and L.DAVIS (1975): Sheep Liver Serine-Threonine Dehydratase. I. Purification and Evidence for Covalently Linked  $\alpha$ -Ketobutyrate as Its Cofactor.  
Biochemistry 14 4273-4276
- KATSUNUMA, T., S. ELSÄSSER and H. HOLZER (1971): Purification and some Properties of Threonine Dehydratase from Yeast.  
Eur.J.Biochem. 24 83-87
- KELLER, R. (1964): Die Aktivitäten von Enzymen der Glycolyse und des Zitronensäurezyklus in den einzelnen Organen des Flußkrebses *Cambarus affinis* Say. Diss. FU Berlin
- , und D. ADELUNG (1970): Vergleichend morphologische u. physiologische Untersuchungen des Integumentgewebes u. des Häutungshormongehaltes beim Flußkrebs *Orconectes limosus* während eines Häutungszyklus.  
Wilhelm Roux' Archiv 164 209-221
- , (1968): Zur hormonalen Blutzuckerregulation bei dekapoden Crustaceen. Habil.schrift FU Berlin
- KUMMEL, G., H. CLAASSEN und R. KELLER (1970): Zur Feinstruktur von Kutikula und Epidermis beim Flußkrebs *Orconectes limosus* während eines Häutungszyklus.  
Z.Zellforsch. 109 157-551
- KU, Y., Q.R. ROGERS and A.E. HARPER (1969): Effects of Thyroxine and Cortisol on Liver Threonine Dehydratase and Tryptophan Pyrrolase in Rats Fed a High Protein Diet.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 130 556-563
- LABOW, R. and W.G. ROBINSON (1966): Crystalline D-Serine Dehydratase (*Escherichia Coli* K-12).  
J.Biol.Chem. 241 1209-1243
- LEFAUCONNIER, J.-M., C. PORTEMER, G. De BILLY, M. IPAKTCHI and F. CHATAGNER (1975): Redistribution of pyridoxal phosphate in the male rat liver as a result of repeated injections of hydrocortisone.  
Biochim.biophys.Acta 297 135-141
- LINEWEAVER, H. and D. BURK (1934): The Determination of Enzyme Dissoziation Constants.  
J.Am.chem.Soc. 56 658-666
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951): Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.  
J.Biol.Chem. 193 265-275

- MAURER, H.R. (1968): Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Verlag Walter de Gruyter & Co Berlin
- MAURON, J., F. MOTTU and G. SPOHR (1973): Reciprocal induction and repression of serine dehydratase and phosphoglycerate dehydrogenase by proteins and dietary essential amino acids in rat liver. *Eur.J.Biochem.* 32 331-342
- MISZCZAK, M., M. SZYMONA and R. JAKUBOWSKI (1974): Effect of the Mechanical Vibration on the Induction of L-Serine Dehydratase in Rat Liver. *Physiol.Chem.and Physics* 6 367-369
- MOHRENWEISER, H.W., and M.B. YATVIN (1972): Regulation of Serine Dehydratase Induction in Rat Liver. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 141 1084-1088
- , M.B. YATVIN and H.C. PITOT (1973): Interaction of Glucagon and Catecholamines in the Regulation of Serine Dehydratase. *Endocrinology* 93 469-477
- , and H.C. PITOT (1974): Studies on the Mechanism of 5-Fluorotryptophan Inhibition of Serine Dehydratase Induction. *Arch.Biochem.Biophys.* 164 663-668
- MORIKAWA, Y., N. NAKAMURA and K. KIMURA (1974): Purification and some Properties of L-Serine Dehydratase of *Corynebacterium* sp. *Agr.Biol.Chem.* 38 551-557
- MUDD, S.H., J.D. FINKELSTEIN, F. IKKVERRE and L. LASTER (1965a): Transsulfuration in Mammals. *J.Biol.Chem.* 240 4382-4392
- , -, -, and - (1965b): Threonine Dehydratase Activity in Humans lacking Cystathionine Synthase. *Biochem.Biophys.Res.Comms.* 19 665-670
- NAGABHUSHANAM, A. and D.M. GREENBERG (1965): Isolation and Properties of a homogeneous Preparation of Cystathionine Synthase-L-Serine and L-Threonine Dehydratase. *J.Biol.Chem.* 240 3002-3008
- NAKAGAWA, H., H. KIMURA and S. MIURA (1967): Crystallization and Characteristics of Serine Dehydratase from Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* 28 359-364
- , S. MIURA, H. KIMURA and T. KANATSUNA (1969): Studies on Substrate Induction of Serine Dehydratase of Rat Liver. *J.Biochem.Tokyo* 66 549-564
- NAKAZAWA, A. and O. HAYASHI (1969): On the Mechanism of Activation of L-Threonine Deaminase from *Clostridium tetanomorphum* by Adenosine Diphosphate. *J.Biol.Chem.* 242 1146-1154

- NISHIMURA, J.S. and D.M. GREENBERG (1961): Purification and Properties of L-Threonine Dehydrase of Sheep Liver. J.Biol.Chem. 236 2684-2691
- PERAINO, C. and H.C. PITOT (1964): Studies on the Induction and Repression of Enzymes in Rat Liver. II. Carbohydrate Repression of Dietary and Hormonal Induction of Threonine Dehydrase and Ornithine- $\delta$ -Transaminase. J.Biol.Chem. 239 4308-4313
- , R.L. BLAKE and H.C. PITOT (1965): Studies on the Induction and Repression of Enzymes in Rat Liver. III. Induction of Ornithine- $\delta$ -Transaminase and Threonine Dehydrase by oral Intubation of Free Amino Acids. J.Biol.Chem. 240 3039-3043
- , C. LAMAR jr., and H.C. PITOT (1966): Studies on the Induction and Repression of Enzymes in Rat Liver. IV. Effects of Cortisone and Phenobarbital. J.Biol.Chem. 241 2944-2948
- PETTE, D. (1968): Aktivitätsmuster und Ortsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels. In F.W. Schmidt (Edit.): Praktische Enzymologie. Bern u. Stuttgart, Verl. H. Huber
- PITOT, H.C. and C. PERAINO (1964): Studies on the Induction and Repression of Enzymes in Rat Liver. I. Induction of Threonine Dehydrase and Ornithine- $\delta$ -Transaminase by oral Intubation of Casein Hydrolysate. J.Biol.Chem. 239 1783-1788
- SAGERS, R.D. and J.E. CARTER (1971): L-Serine Dehydratase (Clostridium acidurici). Methods in Enzymology 17B 351-356
- SANDOVAL, I.V. and A. SOLS (1974): Gluconeogenesis from Serine by the Serine-Dehydratase-Dependent Pathway in Rat Liver. Eur.J. Biochem. 43 608-616
- SAYRE, F.W., D. JENSEN and D.M. GREENBERG (1956\*): Substrate Induction of Threonine Dehydrase in Vivo and in Perfused Rat Livers. J.Biol.Chem. 219 111-117
- , and D.M. GREENBERG (1956): Purification and Properties of Serine And Threonine Dehydrases. J.Biol.Chem. 220 787-799
- SAWAI, S. and H. HATTORI (1970): Increase of Serine Dehydratase and Cystine(Cysteine) Desulfinhydrase in Rat Liver due to a High Protein Diet and the Influence of Vitamin B<sub>6</sub> Deficiency. J.Vitaminology 16 83-85
- SCHMIDINGER, H. and H. ROGER (1967): Zur Hungerinduktion der Serin Dehydratase in der Rattenleber. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348 1367-1371
- SCHWOCH, G. (1972): Untersuchungen zum Stoffwechsel der Trenalose im Flußkrebs Orconectes limosus. Diss. FU Berlin

- SELM, A.S.M. and D.M. GREENBERG (1959): An Enzyme that synthesizes Cystathionine and deaminates L-Serine.  
J.Biol.Chem. 234 1474-1480
- SHAPIRO, A.L., E. VINUELA and J.V. MAIZEL (1967): Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels.  
Biochem.Biophys.Res.Comms. 28 815-820
- SHIZUTA, Y., A. NAKAZAWA, M. TOKUSHIGE and O. HAYAISHI (1969): Studies on the Interaction between Regulatory Enzymes and Effectors. J.Biol.Chem. 244 1883-1889
- SIEBERS, D. (1972): Mechanismen der intrazellulären isosmotischen Regulation der Aminosäurekonzentration bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus*.  
Z.Vergl.Physiol. 76 97-114
- , D. LUCU, K.-R. SPERLING and K. EBERLEIN (1972<sup>\*</sup>): Kinetics of Osmoregulation in the Crab *Carcinus maenas*.  
Marine Biology 17 291-303
- SIMON, D., J. HOSHINO and H. KRÖGER (1973): L-Serine Dehydratase from Rat Liver and Some Properties.  
biochim.Biophys.Acta 321 361-368
- SIMON, D. and H. KRÖGER (1974): Interactions of L-Serine Dehydratase from Rat Liver with Its Coenzyme and Substrates.  
Biochim.Biophys.Acta 334 208-217
- SIMON, J.P., J.M. SCHÖRR and A.T. PHILLIPS (1974): Interactions of 5'-Adenosine Diphosphate and L-Threonine with the Quaternary Structure of L-Threonine Dehydratase.  
I. Nature of the Enzymic Substructure.  
J.Biol.Chem. 249 1993-1999
- SNELL, K. and D.G. WALKER (1974): Regulation of Hepatic L-Serine Dehydratase and L-Serine-Pyruvate Aminotransferase in the Developing Neonatal Rat.  
Biochem.J. 144 519-531
- SPECK, U. (1967): Das Kohlenhydratspektrum in den Organen des Flußkrebses *Orconectes limosus* und seine Veränderungen im Jaresablauf. Diss. FU Berlin
- , und K. URICH (1969): Der Abbau körpereigener Substanzen in dem Flußkrebs *Orconectes limosus* während des Hungers.  
Z.vergl.Physiol. 63 410-414
- , - (1970): Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus*. II. Resorption U-<sup>14</sup>C-markierter Nährstoffe und ihre Verteilung auf die Organe.  
Z.vergl.Physiol. 68 318-330
- , - (1971): Quantitative Bedeutung der Reservestoffe für Chitinsynthese, Energiestoffwechsel und osmotische Vorgänge während der Häutung des Flußkrebses *Orconectes limosus*.  
Z.vergl.Physiol. 71 286-294

- SPECK, U., und K. URICH (1972): Resorption des alten Panzers vor der Häutung bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus*. Schicksal des freigesetzten N-Acetylglucosamins. *Z.vergl.Physiol.* 78 210-220
- , -, und R. HAHMANN (1972<sup>1</sup>): Der Stoffbestand des Flußkrebses *Orconectes limosus*. Jahreszyklus und Organverteilung. *J.Comp.Physiol.* 77 287-305
- , -, und U. HERZ-HUBNER (1972<sup>2</sup>): Nachweis einer Regulation der Glucosaminbildung bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus* zur Zeit der Häutung. *Z.vergl.Physiol.* 76 341-346
- SKERE, P.A. (1967): Enzyme Concentration in Tissues. *Science* 158 936-937
- STEVENSON, J.R., R.H. GUERT and J.D. COLEMAN (1968): Lack of Correlation of some Proecdysial Growth and Developmental Processes in the Crayfish. *Biol.Bull.* 124 160-176
- STRAUS, K., H. JENISSEN und H. KROGER (1970): Zur Regulation der L-Serin-Dehydratase in der Rattenleber. *Z,ges,exp.Med.* 152 294-305
- SUDA, H. (1967): A View of the Comparison of the Regulation of Enzymes in Mammalian and Microbial Systems. *Advanc.Enzymes Regulation* 5 181-209
- SUDA, H. and H. NAKAGAWA (1971): L-Serine Dehydratase (Rat Liver). *Methods in Enzymology XVIIIB* 346-351
- URICH, K. (1961): Mitteldarmdrüsen und Insektenfettkörper als Zentralorgane des Stoffwechsels. *Erg. Biol.* 24 155-190
- , (1964): Die räumliche Ordnung der Stoffwechselprozesse im Metazoenorganismus. *Helgol.wiss.Meeresunters.* 9 150-157
- , (1967a): Aminosäurestoffwechsel in den Organen des Flußkrebses *Orconectes limosus*: Transaminierung, oxidative und nichttoxische Desaminierung. *Z.vergl.Physiol.* 56 95-110
- , (1967b): Biochemische Differenzierung der Organe bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus* Rafinesque. *Sitzg.ber.d.Ges.Naturl.Fr.Berlin,N.F. VII.* 71-78
- , (1968): Die Biochemie der dekapoden Crustaceen. *Verh.d.Dt.Zool.Ges. in Innsbruck 1968* 601-619
- , HERZ-HUBNER, U. und U. SPECK (1973): Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus*. V. Umwandlung der Glucose in den resorbierenden Geweben. *J.Comp.Physiol.* 86 187-191
- WATKINS, R. and A.T. PHILLIPS (1968): Purification and Laboratory Properties of the Adenosine Diphosphate-activated Aspartate Dehydratase. *J.Biol.Chem.* 243 1312-1319

- WARBURG, O., und W. CHRISTIAN (1936): Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridinnucleotide). Biochem. Z. 287 291-328
- WHITELEY, H.R. (1966): Threonine Deaminase of Clostridium tetanomorphum. J. Biol. Chem. 241 4890-4898
- WILLIG, A. und R. KELLER (1973): Molting Hormone Content, Cuticle Growth and Gastrolith Growth in the Molt Cycle of the Crayfish Orconectes limosus. J. Comp. Physiol. 86 377-388
- YAMASHITA, M., S. ARAI, T. ETO, M. FUJIMAKI and Y. SAKURAI (1969): Nutrition of Threonine Part VII. Insulin: a Factor Regulating the Rate of de novo Synthesis of Rat Hepatic Threonine Dehydratase. Agr. Biol. Chem. 33 1007-1012
- YANOFSKY, C. and J.L. REISSIG (1955): Serine Dehydrase of Neurospora. J. Biol. Chem. 202 567-597
- YOSHIDA, T. and G. KIKUCHI (1973): Major Pathways of Serine and Glycine Catabolism in Various Organs of the Rat and Cock. J. Biochem. Tokyo 73 1013-1022
- ZARLENGO, M.H., G.W. ROBINSON and R.O. BURNS (1968): Threonine Deaminase from Salmonella typhimurium. II. The Subunit Structure. J. Biol. Chem. 243 186-191

## Lebenslauf

Am 2. Oktober 1943 wurde ich als Sohn von Arno Tofaute und seiner Ehefrau Hildegard (geborene Schmidt) in Würzburg (Franken) geboren.

Soziale Herkunft: außer bei den Eltern (selbstständig/angestellt) wurde ich einige Jahre in den Familien meiner Großeltern (Beamter) und meines Onkels (Angestellter) erzogen.

Ich lebte in Ansbach, besuchte dort die Güllschule (4 Jahre Grundschule), dann, nach dem im Bundesland Bayern üblichen Aufnahmeprüfungsverfahren, die Oberrealschule Ansbach (heute Platen-Gymnasium). Die Reifeprüfung legte ich am Diesterweg-Gymnasium (Berlin-Wedding) ab.

Im SS 1964 begann ich mein Studium an der Freien Universität Berlin. Das Vordiplom legte ich zu Beginn des WS 1967/68 ab. Von Februar 1969 bis Januar 1970 war ich am Institut für Tierphysiologie und angewandte Zoologie als studentischer Hilfsassistent tätig.

Folgende Professoren, bzw. Dozenten waren meine akademischen Lehrer:

Zoologie: Urich, Kümmel

Botanik: Eckardt, Reinert

Mikrobiologie: Thielke

Elektronenmikroskopie: Giesbrecht

Anorganische Chemie: Janr

Organische Chemie: Hanecke

Biochemie: Riemschneider

Physik: Lassen

physikalische Chemie: Hirschwald

Allgemeine Biologie u. Genetik: Lochmann, Lüers

elektronische Datenverarbeitung: Winguth

Statistik: Belitz, Köhler



